

Université de Montréal

84-1058/c

**TUBÉRIISATION IN VITRO CHEZ DEUX ESPÈCES
D'IGNAMES (GENRE DIOSCOREA)**

cc: Saidu
Koala

par

Martine Jean

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences biologiques

Août, 1989

©Martine Jean, 1989

ARCHIV
582.572
J4

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Tubérisation in vitro chez deux
espèces d'ignames (genre Dioscorea).

présenté par:

Martine Jean

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mémoire accepté le: 25 Oct. 1989

SOMMAIRE

Des microtubercules ont été obtenus par culture *in vitro* de noeuds de *D. abyssinica* et de deux cultivars de *D. alata*, 'Brazo fuerte' et 'Florida'. Afin de faciliter l'élaboration d'un protocole permettant d'obtenir une tubérisation *in vitro* optimale, l'influence exercée par la photopériode, le type de contenant et la composition minérale du milieu nutritif a été étudiée. La fréquence de tubérisation a été notée à toutes les quatre semaines; le rendement et le nombre de microtubercules produits par explantat ainsi que leur poids moyen ont été mesurés après 23 à 25 semaines de culture. Par la suite, l'influence de la taille des microtubercules sur leur pouvoir de germination et le nombre de tiges qu'ils produisent a été analysée.

La fréquence de tubérisation des explantats évolue de façon similaire pour toutes les conditions de culture étudiées. Les premiers microtubercules apparaissent habituellement entre la 8^e et la 12^e semaine de culture. Par la suite, le nombre d'explantats ayant tubérisé augmente tout au long de l'expérience.

La photopériode et la composition minérale du milieu nutritif influencent de façon importante les variables mesurées. Nous avons constaté que les conditions de culture permettant la production d'un nombre élevé de microtubercules sont différentes de celles favorisant un accroissement du poids moyen. En effet, alors que le nombre de microtubercules obtenus en photopériode de 16 h ou 24 h est supérieur à celui des autres photopériodes étudiées, c'est avec un éclairage de 8 h que le poids moyen le plus important est atteint. De même, l'absence de NH_4NO_3 favorise la formation de microtubercules de poids élevé, bien que leur nombre soit légèrement inférieur à celui observé sur le milieu témoin. Enfin, le type de contenant n'exerce une influence importante que chez le cultivar 'Brazo fuerte', où la culture en boîte "Magenta" permet la formation de microtubercules de poids plus élevé qu'en tube.

Les microtubercules de *D. abyssinica* et de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida' peuvent germer *in vitro* et produire des plantules normales, confirmant ainsi qu'ils pourraient être utilisés pour la micropropagation de ces espèces. Nos résultats indiquent que le pouvoir de germination de tels microtubercules est lié à leur taille, bien que l'influence de celle-ci varie selon l'espèce considérée. Cependant, une seule tige est habituellement produite par microtubercule, quelle que soit la taille de ces derniers.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABREVIATIONS	xv
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	11
1- <u>Description du matériel utilisé comme source d'explantats pour les expériences de tubérisation et de germination <i>in vitro</i></u>	11
1.1- Espèces et cultivars étudiés	11
1.2- Repiquage des cultures de réserve	11
1.2.1- Composition du milieu de culture	11
1.2.2- Préparation d'un milieu de culture	13
1.2.3- Explantats mis en culture	13
1.2.4- Conditions de culture	14
2- <u>Expériences sur l'influence de la photopériode et du contenant sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'</u>	14
2.1- Objectifs	14

	Page
2.2- Méthodologie	15
2.2.1- Milieu de culture	15
2.2.2- Contenants de culture	15
2.2.3- Explantats mis en culture	15
2.2.4- Conditions de culture	15
2.2.5- Observations et prise des données	17
2.2.6- Analyses statistiques des données recueillies	18
2.3- Plan des expériences	19
2.3.1- <i>D. abyssinica</i>	19
2.3.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	19
2.3.3- <i>D. alata</i> cv. 'Florida'	20
3- <u>Expériences sur l'influence de modifications de la composition minérale du milieu nutritif sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'</u>	20
3.1- Objectifs	20
3.2- Méthodologie	21
3.2.1- Milieux de culture	21
3.2.1.1- Composition des milieux de culture	21
3.2.1.2- Préparation des milieux de culture	21
3.2.2- Explantats mis en culture	21
3.2.3- Conditions de culture	21
3.2.4- Observations et prise de données	22
3.2.5- Analyses statistiques des données recueillies	22
3.3- Plan des expériences	22
3.3.1- <i>D. abyssinica</i>	22
3.3.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	22
3.3.3- <i>D. alata</i> cv. 'Florida'	23

	<u>Page</u>
4- <u>Essais de germination <i>in vitro</i> des microtubercules de <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'</u>	23
4.1- Objectifs	23
4.2- Méthodologie	23
4.2.1- Milieu de culture	23
4.2.2- Explantats mis en culture	24
4.2.3- Conditions de culture	24
4.2.4- Observations et prise de données	24
4.2.5- Analyses statistiques des données recueillies	25
4.3- Plan des expériences	25
4.3.1- <i>D. abyssinica</i>	25
4.3.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	25
4.3.3- <i>D. alata</i> cv. 'Florido'	27
5- <u>Expériences sur la capacité de germination de fragments de microtubercules de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'</u>	27
5.1- Objectifs	27
5.2- Méthodologie	27
5.2.1- Milieu de culture	27
5.2.2- Explantats mis en culture	27
5.2.3- Conditions de culture	28
5.2.4- Observations et prise de données	28
5.2.5- Analyses statistiques des données recueillies	30
5.3- Plan des expériences	30

	<u>Page</u>
RESULTATS	31
1- <u>Influence de divers paramètres sur l'évolution des explantats de <i>D. abyssinica</i>, <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida' en culture <i>in vitro</i></u>	31
1.1- Description de l'évolution des explantats mis en culture	31
1.1.1- Caractéristiques communes aux trois géotypes étudiés	31
1.1.1.1- Développement de l'appareil caulinaire	31
1.1.1.2- Développement de l'appareil racinaire	32
1.1.1.3- Développement des microtubercules	32
1.1.1.4- Survie et qualité de la réponse des explantats	33
1.1.2- Caractéristiques particulières à un géotype	33
1.1.2.1- <i>D. abyssinica</i>	33
1.1.2.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	33
1.1.2.3- <i>D. alata</i> cv. 'Florida'	35
1.2- Influence de la photopériode sur l'évolution des explantats	36
1.2.1- Caractéristiques communes aux trois géotypes étudiés	36
1.2.2- Caractéristiques particulières à une espèce	40
1.2.2.1- <i>D. abyssinica</i>	40
1.2.2.1.1- Développement de l'appareil caulinaire	40
1.2.2.1.2- Développement de l'appareil racinaire	40
1.2.2.1.3- Développement des microtubercules	42
1.2.2.1.4- Survie et qualité de la réponse des explantats	42
1.2.2.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'	44
1.2.2.2.1- Développement de l'appareil caulinaire	44
1.2.2.2.2- Développement de l'appareil racinaire	44
1.2.2.2.3- Développement des microtubercules	46
1.2.2.2.4- Survie et qualité de la réponse des explantats	46
1.3- Influence du contenant de culture sur l'évolution des explantats	46

	Page
1.4- Influence de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution des explantats	47
1.4.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés	47
1.4.1.1- Développement de l'appareil caulinaire	47
1.4.1.2- Développement de l'appareil racinaire	47
1.4.1.3- Développement des microtubercules	47
1.4.1.4- Survie et qualité de la réponse des explantats	54
1.4.2- Caractéristiques particulières à une espèce	54
1.4.2.1- <i>D. abyssinica</i>	54
1.4.2.1.1- Développement de l'appareil caulinaire	54
1.4.2.1.2- Développement des microtubercules	54
1.4.2.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'	55
1.4.2.2.1- Développement de l'appareil caulinaire	55
1.4.2.2.2- Développement des microtubercules	55
2- <u>Influence de divers paramètres sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'</u>	57
2.1- Influence de la photopériode sur la tubérisation <i>in vitro</i>	57
2.1.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés	57
2.1.2- Caractéristiques particulières à une espèce	65
2.1.2.1- <i>D. abyssinica</i>	65
2.1.2.1.1- Rendement en microtubercules	65
2.1.2.1.2- Nombre de microtubercules produits	65
2.1.2.1.3- Poids moyen des microtubercules	65
2.1.2.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'	65
2.1.2.2.1- Rendement en microtubercules	65
2.1.2.2.2- Nombre de microtubercules produits	66
2.1.2.2.3- Poids moyen des microtubercules	66

	<u>Page</u>
2.2- Influence du contenant de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i>	66
2.2.1- <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Florida'	67
2.2.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	67
2.3-Interaction entre la photopériode et le contenant de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i>	67
2.4-Influence de la composition minérale du milieu nutritif sur la tubérisation <i>in vitro</i>	68
2.4.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés	68
2.4.2- Caractéristiques particulières à une espèce	68
2.4.2.1- <i>D. abyssinica</i>	68
2.4.2.1.1- Rendement en microtubercules	68
2.4.2.1.2- Poids moyen des microtubercules	68
2.4.2.2- <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'	71
2.4.2.2.1- Rendement en microtubercules	71
2.4.2.2.2- Nombre de microtubercules produits	71
2.4.2.2.3- Poids moyen des microtubercules	71
3- <u>Essais de germination <i>in vitro</i> de microtubercules de <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'</u>	76
3.1- Généralités	76
3.2- Essais de germination <i>in vitro</i> de microtubercules entiers	80
3.2.1- Evolution des microtubercules mis en culture	80
3.2.2- Fréquence de germination des microtubercules	82
3.2.3- Nombre de tiges produites par microtubercule	82

	<u>Page</u>
3.3- Essais de germination des fragments de microtubercules de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	85
3.3.1- Généralités	85
3.3.2- Evolution des fragments de microtubercules	85
3.3.3- Fréquence de germination des microtubercules	86
3.3.4- Nombre de tiges produites par microtubercule	86
 DISCUSSION	 90
1- Evolution des explantats en culture <i>in vitro</i>	90
2- Obtention de microtubercules utilisables pour la propagation de l'igname	91
3- Comparaison de l'influence des paramètres étudiés sur la tubérisation de diverses espèces d'ignames	93
3.1- Contenant de culture	93
3.2- Photopériode	94
3.3- Composition en sels minéraux du milieu nutritif	95
4- Hypothèse sur le mode d'action des conditions de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i>	97
 CONCLUSION	 99
 REFERENCES	 xvi
 REMERCIEMENTS	 xx

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
Tableau I. Essais de micropropagation chez quelques espèces du genre <i>Dioscorea</i>	6
Tableau II. Composition des divers milieux de culture utilisés au cours du présent travail.	12
Tableau III. Effectifs mis en culture pour chaque catégorie de micro-tubercules lors d'essais de germination <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.	26
Tableau IV. Effectifs mis en culture pour chaque catégorie de fragments de microtubercules lors d'essais de germination <i>in vitro</i> chez <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	29
Tableau V. Résultats d'analyses de variance (ANOVA) effectuées pour détecter l'existence d'une influence de la photopériode, du type de contenant et de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.	58
Tableau VI. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> .	59
Tableau VII. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. alata</i> cv. 'Brazofuerte'.	60
Tableau VIII. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. alata</i> cv. 'Florida'.	61
Tableau IX. Influence de la photopériode sur la distribution des microtubercules de <i>D. abyssinica</i> .	62

Page

Tableau X.	Influence de la photopériode sur la distribution des microtubercules de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	63
Tableau XI.	Influence de la photopériode sur la distribution des microtubercules de <i>D. alata</i> cv. 'Florido'.	64
Tableau XII.	Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. abyssinica</i> .	69
Tableau XIII.	Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la distribution de microtubercules de <i>D. abyssinica</i> .	70
Tableau XIV.	Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	72
Tableau XV.	Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation <i>in vitro</i> chez <i>D. alata</i> cv. 'Florido'.	73
Tableau XVI.	Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la distribution de microtubercules de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	74
Tableau XVII.	Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la distribution de microtubercules de <i>D. alata</i> cv. 'Florido'.	75

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
Figure 1. Matériels utilisés pour les expériences de tubérisation <i>in vitro</i>	16
Figure 2. Effets du ANA sur le système racinaire des plantules de <i>D. abyssinica</i> et de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	34
Figure 3. Influence de la photopériode et du type de contenant sur l'évolution de la tubérisation chez <i>D. abyssinica</i> .	37
Figure 4. Influence de la photopériode et du type de contenant sur l'évolution de la tubérisation chez <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	38
Figure 5. Influence de la photopériode et du type de contenant sur l'évolution de la tubérisation chez <i>D. alata</i> cv. 'Florido'.	39
Figure 6. Influence de la photopériode sur le développement des plantules de <i>D. abyssinica</i>	41
Figure 7. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la réponse des explantats de <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.	43
Figure 8. Influence de la photopériode sur le développement des plantules de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.	45
Figure 9. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des plantules de <i>D. abyssinica</i>	48
Figure 10. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des plantules de <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	49

Figure 11. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des plantules de <i>D. alata</i> cv. 'Florida'.	50
Figure 12. Influence de modifications de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution de la tubérisation chez <i>D. abyssinica</i> .	51
Figure 13. Influence de modifications de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution de la tubérisation chez <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.	52
Figure 14. Influence de modifications de la composition minérale du milieu de culture sur la réponse des explantats de <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.	53
Figure 15. Malformations observées chez les plantules de <i>D. alata</i> cv. 'Florida' produites sur un milieu de culture ne contenant pas de KNO_3 .	56
Figure 16. Relation entre le poids et la taille des microtubercules chez <i>D. abyssinica</i> .	77
Figure 17. Relation entre le poids et la taille des microtubercules chez <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'.	78
Figure 18. Relation entre le poids et la taille des microtubercules chez <i>D. alata</i> cv. 'Florida'.	79
Figure 19. Influence de la taille des microtubercules de <i>D. abyssinica</i> et de <i>D. alata</i> cv. 'Florida' sur le développement des plantules qu'ils produisent.	81
Figure 20. Influence de la taille sur la fréquence de germination des microtubercules de <i>D. abyssinica</i> et <i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.	83

- Figure 21. Influence de la taille sur le nombre de tiges produites par les microtubercules de *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'. 84
- Figure 22. Influence de la taille des microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' sur le développement des plantules produites par leurs fragments. 87
- Figure 23. Influence de la fragmentation sur la fréquence de germination des microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'. 88
- Figure 24. Influence de la fragmentation sur le nombre de tiges produites par les microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'. 89

LISTE DES ABREVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ABA	Acide abscissique
ANA	Acide α -naphtalène acétique
BA	Benzyl-adénine
ACPIB	Acide α -(o-chlorophénoxy)-isobutyrique
HM	Hydrazine maléique
KIN	Kinétine
MS	Murashige et Skoog (1962)
ZEA	Zéatine

INTRODUCTION

L'igname est la plante nourricière par excellence pour des millions de personnes dans les tropiques. Elle se classe au 2^e rang parmi les espèces à tubercules comestibles cultivées dans ces régions, et au 3^e ou 4^e rang en importance au niveau mondial (Degras, 1986).

Le terme "igname" est employé pour désigner d'une façon générale toutes les plantes du genre *Dioscorea* et particulièrement celles présentant un intérêt économique pour l'Homme. Ce sont des monocotylédones de la famille des Dioscoréacées, de l'ordre des Dioscoréales (Ayensu, 1972).

Les ignames sont des plantes volubiles qui croissent en s'enroulant autour d'un tuteur. Leurs tiges forment un réseau dense qui atteint facilement 25 à 30 mètres de long. Les feuilles, longuement pétiolées et de forme cordée-acuminée, sont nombreuses et disposées de façon alterne ou opposée-décussée (Degras, 1986).

Les tiges aériennes sont annuelles. La survie de la plante est assurée par un tubercule souterrain d'origine caulinare. D'une taille variant entre 20 et 40 centimètres de longueur, il pèse fréquemment de 2 à 5 kilogrammes (Degras, 1986). Il se forme à la fin de la croissance végétative de la plante et reste en dormance durant la saison sèche. Puis, au retour des conditions favorables, il produit une tige, rarement plus. Celle-ci se développe aux dépens des réserves du tubercule, qui s'épuise graduellement et finit par disparaître (Onwueme, 1978 ; Purseglove, 1973).

Les tubercules d'ignames ont une bonne valeur nutritive. Bien que composés de 65 à 70 % d'eau, ils contiennent de 15 à 25 % de glucides (principalement de l'amidon), de 1 à 2,5 % de protéines ainsi qu'une concentration élevée en vitamine C, soit environ 10 mg d'acide ascorbique par 100 g de tubercule. Ils sont aussi une source intéressante de vitamine B et de plusieurs minéraux utiles (Degras, 1986 ; Purseglove, 1973). Enfin, les tubercules de diverses espèces sauvages

fournissent des sapogénines qui peuvent être utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'hémisynthèse de cortico-stéroïdes ainsi que de plusieurs hormones entrant dans la composition de la pilule contraceptive (Degras, 1986 ; Coursey, 1967).

La production mondiale d'ignames est surtout concentrée en Afrique occidentale, dans les Antilles ainsi que dans le Sud-Est asiatique. Les trois principales espèces cultivées sont *Dioscorea alata* L., *D. cayenensis* Lam. et *D. rotundata* Poir.. D'autres espèces telles que *D. bulbifera* L., *D. esculenta* (Lour.) Burk., *D. opposita* Thunb. et *D. trifida* L. sont aussi utilisées, mais à une échelle plus restreinte. Enfin certaines espèces sauvages ou semi-sauvages comme *D. abyssinica* Hochst. et *D. hispida* Dennst sont consommées en période de famine (Degras, 1986 ; Onwueme, 1978 ; Coursey, 1967).

Bien que l'igname occupe une place importante dans les traditions de plusieurs populations (Coursey, 1967), on assiste à un certain déclin de sa culture. En effet, celle-ci subit de plus en plus la concurrence de cultures d'exportation telles le café, le cacao et le hevea, ainsi que de celle de plantes moins exigeantes et plus productives comme le manioc (*Manihot utilissima* Pohl.) (Degras, 1986 ; Ammirato, 1984).

La culture de l'igname exige des sols riches et nécessite beaucoup de travail manuel. En effet, des buttes sont élevées à la base de chaque plant pour permettre au tubercule de croître tout en restant enfoui dans le sol. Ces monticules sont ensuite recouverts de paillis afin d'éviter une trop forte augmentation de la température du sol durant la saison chaude. De fréquents désherbages sont nécessaires au début de la culture pour que la jeune plante puisse jouir d'un maximum de lumière. Plus tard au cours de la saison, les tiges grimpantes sont tuteurées pour obtenir un rendement maximal. Enfin, comme l'énorme tubercule pousse plus ou moins à la verticale dans le sol et que son écorce est mince et fragile, la récolte se fait à la main pour éviter les cassures et les meurtrissures qui en diminueraient la valeur marchande et en réduiraient la pouvoir de conservation (Degras, 1986 ; Onwueme, 1978 ; Coursey, 1967).

L'igname est une plante à croissance lente, qui demande de huit à dix mois de culture avant la récolte. Il ne peut donc y en avoir qu'une seule par an. Les rendements assez faibles, de 10 à 15 tonnes/hectare (Degras, 1986), ainsi que d'importants problèmes liés à la manutention et à la distribution des tubercules, réduisent considérablement la disponibilité de ce produit sur le marché. De plus, le pourrissement, l'attaque de certains insectes et rongeurs, la déshydratation ainsi que le processus de levée précoce de la dormance, causent d'énormes pertes au cours de la conservation (Onwueme, 1978 ; Coursey, 1967). Celles-ci atteignent fréquemment 30 à 50% de la récolte (Coursey, 1967) et parfois plus (Doukoure, communication personnelle).

Une bonne partie de la récolte n'est d'ailleurs pas utilisée pour la consommation, étant en effet conservée comme semence pour l'année suivante. Or il existe une corrélation étroite entre la taille des fragments de tubercules mis en culture et le rendement obtenu, des fragments trop petits ne donnant que des récoltes médiocres (Onwueme, 1978 ; Coursey, 1967). Ce phénomène oblige le cultivateur à garder jusqu'à 35% de sa récolte en vue des plantations futures (NG, 1988).

Les améliorateurs d'ignames ont donc pour objectifs de développer des cultivars qui soient plus productifs et qui présentent des caractéristiques facilitant la culture ou la propagation. Ce serait par exemple une courte période de croissance, une résistance accrue à certaines maladies (particulièrement celles survenant pendant la conservation), un port érigé permettant de réduire le tuteurage, des tubercules aptes à subir une récolte mécanique et enfin, la restauration de la fertilité ou le développement de propagules permettant d'éviter l'emploi de fragments de tubercules comme semence (Ammirato, 1984 ; Onwueme, 1978).

Les méthodes traditionnelles d'amélioration font appel à la reproduction sexuée pour produire et sélectionner de nouvelles combinaisons génétiques intéressantes. Or, l'igname est une plante dioïque et nombre de cultivars hautement prisés ne sont malheureusement composés que de plants de l'un ou l'autre des sexes (Degras, 1986 ; Onwueme, 1978 ; Coursey, 1976). De plus, peu d'espèces cultivées produisent régulièrement des graines. La complexité cytogénétique de cette plante ainsi qu'une

tradition séculaire de propagation végétative pourraient être à l'origine de ces importants problèmes de fertilité. Les chromosomes sont nombreux et très petits, et bien que la plupart des espèces cultivées aient un nombre chromosomique de $2n = 4x = 40$, les exceptions sont fréquentes. En effet, de nombreux cas de polyploïdie ont été signalés (comprenant des comptes allant de 50 à 140) ainsi que plusieurs aneuploïdes de même que des chimères (Degras, 1966 ; Coursey, 1976 ; Cappadocia, communication personnelle).

Les techniques de culture *in vitro* offrent un outil nouveau aux améliorateurs. Elles pourraient permettre d'utiliser l'énorme hétérogénéité des clones actuels pour sélectionner et propager rapidement les individus présentant des caractéristiques intéressantes. De même, diverses méthodes pourraient être employées pour obtenir des phénotypes nouveaux, comme par exemple l'application de traitements mutagènes ou même une manipulation génétique plus directe. Finalement, la thermothérapie combinée à la culture de méristèmes peut débarrasser l'igname des nombreuses viroses qui réduisent le rendement des plantes propagées essentiellement par voie végétative. Cette technique a d'ailleurs déjà été utilisée par Mantel et coll. (1980) chez *D. alata* pour éliminer certains virus responsables du "flexous rod".

Chez l'igname, la diffusion de cultivars-élites auprès des cultivateurs est retardée par l'absence de moyen rapide de multiplication. L'utilisation de la micropropagation pourrait aider à solutionner ce problème. Cette technique a d'ailleurs déjà fait ses preuves chez plusieurs plantes ornementales et maraîchères (ex. orchidées, oeillets, chrysanthèmes, fraisiers). Mantel et coll. (1978) estime qu'en comptant sur un cycle de 3 à 5 semaines et un taux de multiplication variant entre 3 et 5, une culture de segments nodaux de *D. alata* ou *D. rotundata* fournirait un total de 65 000 plantules en 6 mois! Les plantules d'ignames obtenues *in vitro* sont faciles à acclimater et montrent un très haut degré d'uniformité ("true-to-type") (Ammirato, 1984 ; Chaturvedi et coll., 1982). Elles ont un développement comparable à celui de plantes issues de graines et les tubercules qu'elles produisent pourraient servir de semences pour les agriculteurs (Lacointe et Sinzou, 1987).

Comme l'organogénèse à partir de cal augmente les risques de variations somaclonales, la plupart des chercheurs utilisent des explantats permettant une régénération directe (tableau I). Chez l'igname, comme chez presque toutes les monocotylédones, les tissus complètement différenciés tels que les entrenœuds et les disques foliaires, se révèlent généralement incapables de régénérer des plantes ou des embryons somatiques. Sinha et Chaturvedi (1979) ont toutefois obtenu le développement de tiges adventives sur la base de pulvinus de feuilles de *D. floribunda*. Les cultures sont donc habituellement initiées à partir de segments nodaux ainsi que d'apex, de méristèmes, de structures embryonnaires ou de tissus provenant de tubercules. En effet, le cortex de ceux-ci contient une importante zone cambiale (Martin et Ortiz, 1963).

Lorsque des segments nodaux suffisamment grands (1 à 2 cm) sont mis en culture, le développement de tiges et de racines s'avère possible sur un milieu sans hormone. Cependant, la présence de celles-ci est indispensable lors de culture d'apex ou de méristèmes. D'ailleurs, en général, la présence d'auxines et de cytokinines exerce un effet bénéfique sur les cultures. Les cytokinines agissent principalement sur le système caulinaire: selon la concentration employée, elles induisent la production de multiples tigelles ou favorisent leur élongation (Forsyth et Van Staden, 1982 ; Heble et Staba, 1980 ; Sinha et Chaturvedi, 1979 ; Ammirato, 1976 ; Chaturvedi, 1975). Les auxines facilitent quant-à-elles l'enracinement (Sengupta et coll., 1984 ; Forsyth et Van Staden, 1982 ; Sinha et Chaturvedi, 1979 ; Lakshmi Sita et coll., 1976 ; Chaturvedi, 1975). Cependant, lorsqu'elles sont utilisées à de concentrations trop élevées, la formation de cal est observée (Ammirato, 1976 ; Lakshmi Sita et coll., 1976).

Un phénomène fréquemment observé chez les cultures *in vitro* d'ignames est le brunissement graduel du milieu autour de l'extrémité coupée de l'explantat. Asahira et Nitsch (1969) l'attribue à l'émission des composés phénoliques contenant le groupement catéchole et constate que les conditions de culture employées influencent l'intensité du phénomène. Cependant, ce brunissement ne paraît généralement pas affecter la réponse des explantats. L'usage d'anti-oxydants ainsi qu'une diminution de

Tableau I. Essais de micropropagation chez quelques espèces du genre *Dioscorea*

référence	espèce	explantat	hormone ¹	structure générée ³
Ammirato, 1976 Ammirato, 1982	<i>D. bulbifera</i>	noeud	ZEA	tiges multiples
	<i>D. alata</i>	noeud	-	tige
	cv. 'Gemelos'	apex	ZEA/ANA	tige
	<i>D. bulbifera</i>	noeud	-	tige
		apex	ZEA/ANA	tige
		noeud	1 ^o BA ou ZEA/2,4-D	cal
			2 ^o ZEA ou ABA	embr. som.
	<i>D. composita</i>	noeud	-	tige
		apex	ZEA/ANA	tige
	<i>D. floribunda</i>	noeud	-	tige
Asokan et coll., 1983		apex	ZEA/ANA	tige
		embryon	1 ^o 2,4-D	cal
Chaturvedi, 1975			2 ^o ZEA ou ABA	embr. som.
			KIN/2,4-D ²	cal et
Forsyth et Van Staden, 1982	<i>D. alata</i>	tubercule		tiges multiples
	cv. 'Purple-fleshed'			
Heble et Staba, 1980	<i>D. floribunda</i>	noeud	BA	tiges multiples
	<i>D. bulbifera</i>	noeud	BA ou KIN	tiges multiples
Lacointe et Sinzou, 1987	<i>D. composita</i>	noeud	BA	tiges multiples
	<i>D. alata</i>	noeud	-	tige
Lakshmi Sita et coll., 1976	cv. 'Lupias'			
	<i>D. floribunda</i>	noeud	KIN et/ou ANA	tige

Tableau I. Essais de micropropagation chez quelques espèces du genre *Dioscorea* (suite).

Mantel et coll., 1978	<i>D. alata</i> cv. 'White Lisbon'	noeud	-	tige
Mantel et coll., 1980	<i>D. rotundata</i>	noeud	-	tige
	<i>D. alata</i> cv. 'White Lisbon'	apex	BA/ANA ou KIN/ANA	tige
		méristème	BA/2,4-D ou BA/ANA	tige
Sengupta et coll., 1984	<i>D. floribunda</i>	noeud	BA/2,4-D et/ou ANA	cal et tiges multiples
Singh, 1978	<i>D. deltoidea</i>	tubercule	1 ^e 2,4-D 2 ^e KIN/2,4-D ²	cal tiges multiples ou embr. som.
Sinha et Chaturvedi, 1979	<i>D. floribunda</i>	pulvinus (pétiole)	BA/ANA	tiges multiples
Viana et Mantel, 1989	<i>D. composita</i>	embryon	1 ^e 2,4-D 2 ^e ZEA	cal tiges multiples
	<i>D. cayenensis</i>	embryon	1 ^e 2,4-D 2 ^e ZEA	cal tiges multiples

¹ Composition hormonale du milieu permettant d'obtenir les meilleurs résultats. Le milieu de base employé est habituellement celui de Murashige et Skoog (1962). Le symbole "-" désigne un milieu ne contenant pas d'hormones ; les notations "1^e" et "2^e" représentent un changement de milieu de culture.

² Modifications de la composition en sels minéraux du milieu de culture.

³ embr. som. = embryons somatiques ; tiges multiples = production de plus d'une tige par explantat mis en culture

l'intensité lumineuse (inhibant la synthèse phénolique) ou un bref séjour sur un papier-filtre mouillé avant l'inoculation, peuvent toutefois aider à contrôler ce phénomène (Ammirato, 1984).

Lors d'expériences de micropropagation, les chercheurs notent parfois l'apparition de microtubercules (Sengupta et coll., 1984 ; Forsyth et Van Staden, 1982 ; Chaturvedi, 1975). Ceux-ci sont formés par les bourgeons axillaires des explantats mis en culture ou des plantules qu'ils ont produites. Le développement de tubercules sur des noeuds est d'ailleurs fréquemment observée lors de bouturage en serre (Onwueme, 1978 ; Coursey, 1967). De même, plusieurs espèces forment des tubercules aériens (aussi nommés bulbilles) au cours de cultures normales en champ. Chez *D. bulbifera* L., ces bulbilles sont produites en très grande quantité et sont utilisées pour la consommation humaine (Degras, 1986 ; Ayensu, 1972).

La tubérisation *in vitro* pourrait offrir un excellent moyen de conserver et de distribuer facilement des cultivars-élites d'ignames. Les microtubercules ainsi produits faciliteraient aussi les échanges au niveau international. Leur transport et leur manipulation nécessitent en effet moins de précautions et de soins que celui des plantules *in vitro*. Ils peuvent être mis à germer *in vitro* et les plantules obtenues sont acclimatées et transférées en terre comme des vitroplants normaux. Les tubercules qu'elles produisent sont de taille suffisante pour être utilisés comme semenceaux par les cultivateurs (NG, 1988). De plus, les microtubercules peuvent aussi être semés directement en terre (Ammirato, 1982).

Les microtubercules produits *in vitro* pourraient être utilisés pour des études fondamentales portant sur la dormance et la germination ainsi que sur les problèmes de conservation. Ils seraient aussi une source intéressante de matériel pour certaines expériences de manipulations génétiques. En effet, quelques chercheurs qui travaillent actuellement sur la transformation génétique de l'igname à l'aide de *Agrobacterium tumefaciens*, utilisent des disques de tubercules comme matériel à infecter (Schäfer et coll., 1987). Ceux-ci nécessitent une stérilisation qui pourrait être évitée par l'emploi de microtubercules obtenus *in vitro*.

Les facteurs affectant la tubérisation *in vitro* chez l'igname sont cependant moins bien connus que chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Les principaux travaux effectués ont porté sur l'influence d'hormones et de régulateurs de croissance ainsi que sur l'action d'autres composantes du milieu de culture (concentration en saccharose, source d'azote disponible) et de la photopériode.

Les faibles concentrations d'auxines ainsi que les concentrations modérées de cytokinines augmentent la tubérisation (Mantel et Hugo, 1989 ; Ammirato, 1982 ; Asahira et Yazawa, 1979 ; Ammirato, 1976 ; Uduebo, 1971 ; Asahira et Nitsch, 1968). Un milieu contenant autour de 5% de saccharose est généralement estimé optimal (NG, 1988 ; Lauzer, communication personnelle), bien qu'une concentration plus élevée soit bénéfique chez certaines espèces d'ignames (Forsyth et Van Staden, 1984 ; Asahira et Yazawa, 1979). Diverses expériences ont permis de constater que l'absence d'ions ammonium ainsi qu'un rapport élevé nitrate/ammonium facilitent la production de microtubercules (Asahira et Yazawa, 1979 ; Asahira et Nitsch, 1968). Enfin, bien qu'une longue photopériode favorise fréquemment la tubérisation (NG, 1988 ; Forsyth et Van Staden, 1984), certains chercheurs estiment préférable l'emploi de photopériodes plus courtes (Mantel et Hugo, 1989 ; Lauzer, communication personnelle).

Les expériences faisant l'objet du présent travail ont été effectuées entre août 1987 et février 1989. Elles font suite à un projet subventionné par le Centre de recherches pour le développement international (CRDI) qui a été entrepris vers 1985 par le laboratoire du docteur Mario Cappadocia de l'Institut botanique (Université de Montréal) en collaboration avec l'Université d'Abidjan (Côte-d'Ivoire). Ce programme de recherche consistait en l'analyse génétique de plusieurs espèces d'ignames ainsi qu'en divers essais de multiplication *in vitro*.

Au cours du présent travail, nous avons voulu déterminer l'influence de la photopériode et de certains des composants minéraux du milieu nutritif (particulièrement ceux servant de source d'azote) sur la

production de microtubercules chez deux espèces d'ignames, *D. abyssinica* Hochst. et *D. alata* L.. La première est une espèce sauvage des savanes d'Afrique, parfois utilisée pour l'alimentation humaine en période de famine (Coursey, 1967). Selon Coursey (1976), cette plante pourrait avoir contribué au patrimoine génétique de *D. rotundata* Poir., une des principales espèces cultivées d'Afrique. La culture de *D. alata* est quant à elle très répandue dans le monde. Les deux cultivars de cette espèce employés dans le cadre de cette étude, soit 'Brazo fuerte' et 'Florida', sont fréquemment utilisés dans la région des Antilles et sont cultivés à titre expérimental en Côte-d'Ivoire.

Enfin, nous avons aussi étudié l'influence exercée par la taille des microtubercules sur le pouvoir de germination *in vitro*, ceci afin de tenter d'évaluer le potentiel des microtubercules comme moyen de micro-propagation chez l'igname.

MATERIEL ET METHODES

1- Description du matériel utilisé comme source d'explantats pour les expériences de tubérisation et de germination *in vitro*

1.1- Espèces et cultivars étudiés

Au cours de travaux sur la cytogénétique et la multiplication *in vitro* de diverses *Dioscorea* effectués en 1985 par le docteur Mario Cappadocia de l'Institut botanique (Université de Montréal), des cultures *in vitro* de plusieurs espèces d'ignames ont été initiées. Les plantes ayant servi de source d'explantats ont été obtenues par germination en serre de tubercules-semences fournis par l'Université d'Abidjan (Côte-d'Ivoire). Depuis lors, ces espèces sont maintenues *in vitro* à l'Institut botanique sous forme de cultures de segments nodaux.

Les explantats utilisés pour effectuer le présent travail sont prélevés sur de telles cultures de réserve au moment d'un repiquage. Deux espèces d'ignames sont étudiées. Il s'agit de *D. abyssinica* Hochst. ($2n = 40$)¹ et de *D. esala* L. ($2n = 40$)². Pour cette dernière, deux cultivars différents sont comparés: 'Brazo fuerte' et 'Florida'.

1.2- Repiquage des cultures de réserve

1.2.1- Composition du milieu de culture

Le milieu utilisé pour le repiquage des cultures de réserve (tableau II) est une variante du milieu de Murashige et Skoog (1962) dont

¹ Le matériel utilisé s'est toutefois révélé chimérique, possédant 38 et 40 chromosomes dans les cellules de pointes de racine (Laublin, communication personnelle).

² (Laublin, communication personnelle)

Tableau II. Composition des divers milieux de culture utilisés au cours du présent travail.

	MS ¹	Milieu de maintien	Milieu de tubérisation	Milieu de germination
Sels majeurs (mg/L)				
KNO ₃	1900	1900	1900 ²	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650 ²	1650
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	440	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
Sels mineurs (mg/L)				
Na ₂ -EDTA	37,2	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,9	27,8	27,8	27,8
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2
KI	0,830	0,830	0,830	0,830
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,250	0,250	0,250	0,250
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
Vitamines/ac. aminés (mg/L)				
Inositol	100,0	100,0	100,0	100,0
Acide nicotinique	0,5	0,5	0,5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Thiamine HCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Glycine	2,0	----	----	----
Hormones (mg/L)				
AIA	1-30	----	----	----
ANA	----	0,5	0,5	0,5
KIN	0,04-10	----	----	----
Saccharose (g/L)	30	20	40	30
Agar (Difco Bacto) (g/L)	10	7	7	7
pH	5,7	5,8	5,8	5,8

¹ Description du milieu de Murashige et Skoog (1962).

² Facultatif dans certains milieux.

il contient les sels minéraux et les vitamines, additionné d'une faible concentration d'auxine (0,5 mg/L de ANA), de 20 g/L de saccharose et de 7 g/L d'agar (Difco Bacto). Il ne comporte toutefois pas de glycine, contrairement au milieu MS original.

1.2.2- Préparation d'un milieu de culture

L'eau employée pour faire les milieux de culture est ultra-purifiée par un système de filtration Milli-RO/Milli-Q (compagnie Millipore). La plupart des ingrédients sont conservés au réfrigérateur sous forme de solutions concentrées. Les sels minéraux proviennent d'un mélange commercial ("MS salt base", compagnie Carolina) dissous pour former une solution concentrée (10 fois). Les solutions de ANA et de vitamines sont préparées à une concentration de 100 mg/L, à l'exception de celle d'inositol qui est de 10 g/L. Le saccharose et l'agar sont pesés au moment d'être utilisés.

Lors de la préparation d'un milieu de culture, la quantité appropriée de chacune des substances est combinée dans un certain volume d'eau (sauf l'agar qui n'est ajouté qu'à la fin) et le mélange est agité jusqu'à dissolution complète du saccharose. Le volume du milieu est ensuite complété, puis le pH est ajusté à 5,8 à l'aide de NaOH ou de HCl. L'agar est alors incorporé et le milieu est chauffé pour en permettre la dissolution. Le mélange est finalement distribué dans des boîtes de polycarbonate de 7 cm X 7 cm X 10 cm munies d'un couvercle de polypropylène incolore et translucide ("Magenta GA7 vessel", compagnie Magenta), à raison de 50 ml par boîte. Celles-ci sont autoclavées 30 minutes à 111°C sous une pression de 0,5 kg-cm².

1.2.3- Explantats mis en culture

Des plantules de cultures de réserve âgées d'environ 20 semaines sont disséquées pour former des segments multinodaux (3 noeuds et plus) de 2 à 3 cm. Les feuilles ainsi que les racines aériennes, si présentes, sont disséquées et éliminées. Les explantats sont inoculés à la verticale (portion inférieure enfoncée dans le milieu) à raison de quatre ou cinq par contenant.

1.2.4- Conditions de culture

Les cultures de réserve sont conservées à une photopériode de 16 h dans la salle de culture de l'Institut botanique. Un éclairage indirect, d'une intensité variant de 800 à 1200 lux, est fourni par des tubes fluorescents de type "F40 Cool White". La température est de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant la période éclairée et de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durant la phase obscure.

2- Expériences sur l'influence de la photopériode et du contenant sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'

2.1- Objectifs

Ce type d'expériences a pour but de déterminer l'influence de la photopériode sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'. Les quatre photopériodes étudiées sont: 0 h (obscurité constante), 8 h (jour court), 16 h (jour long) et 24 h (éclairage constant). Certaines contraintes techniques nous obligeant à restreindre le nombre de photopériodes employées, notre choix s'est porté vers les conditions de culture estimées les plus contrastées. C'est pourquoi une photopériode de 12 h n'a pas été utilisée, bien qu'elle corresponde à celle de plusieurs pays où se pratique la culture de l'igname.

Enfin, une partie des explantats utilisés est inoculée dans des boîtes "Magenta" et l'autre dans des tubes "Kimble", afin de vérifier si le contenant de culture affecte la tubérisation.

2.2- Méthodologie

2.2.1- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé contient les sels minéraux et les vitamines du milieu MS (voir tableau II) ainsi qu'une faible concentration d'auxine (0,5 mg/L de ANA), 40 g/L de saccharose et 7 g/L d'agar (Difco Bacto). Il est préparé de la façon décrite à la section 1.2.2 et distribué dans les contenants à raison de 10 ml par tube et de 50 ml par boîte.

2.2.2- Contenants de culture

Les deux types de contenants étudiés (figure 1 A) sont des tubes de borosilicate (Pyrex) de 25 mm X 150 mm fermés par un bouchon de polypropylène incolore et translucide (compagnie Kimble), et des boîtes de polycarbonate de 7 cm X 7 cm X 10 cm munies d'un couvercle de polypropylène incolore et translucide ("Magenta GA7 vessel", compagnie Magenta). Les explantats y sont inoculés en position verticale, bourgeons hors du milieu, à raison d'un explantat par tube et de quatre explantats par boîte.

2.2.3- Explantats mis en culture

Les explantats sont prélevés sur des cultures de réserve âgées de 17 à 18 semaines. Ce sont des segments uninodaux d'environ 1 cm, comprenant une portion de tige au-dessus et au-dessous du noeud ainsi qu'une petite partie du pétiole, feuille disséquée (explantats en forme de "Y", figure 1 B). Afin de maintenir une certaine uniformité dans l'âge physiologique des explantats utilisés, seuls ceux dont la feuille était épanouie mais dont les bourgeons axillaires n'avaient pas encore développé de tiges ou racines, ont été mis en culture.

2.2.4- Conditions de culture

Les cultures soumises à une photopériode de 16 h sont gardées dans la salle de culture de l'Institut botanique tout comme celles maintenues en obscurité constante, qui y sont conservées sous un

Figure 1. Matériel utilisé pour les expériences de tubérisation *in vitro*

A- Type de contenants de culture.

A gauche, boîte "Magenta".

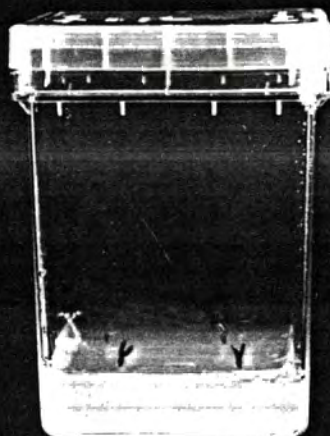
A droite, tube "Kimble".

B- Type d'explantats mis en culture.

A gauche, portion supérieure d'une plantule de réserve
utilisée comme source d'explantats.

A droite, explantats d'environ 1 cm.

1 A



1 B



Y-
Y-
Y-
Y-
Y-

emballage cartonné opaque. Les photopériodes de 8 h et 24 h sont obtenues dans des incubateurs (modèle 1-35BL, compagnie Percival). Dans tous les cas, l'éclairage est fourni par des tubes fluorescents de type "F40 Cool White". L'intensité lumineuse est de 4750 à 6750 lux dans la salle de culture et de 2500 à 4500 lux dans les incubateurs. La température est maintenue à 25°C pendant la période éclairée et à 21°C durant la phase obscure, avec un écart maximum de $\pm 2^\circ\text{C}$ dans la salle de culture et de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ dans les incubateurs.

2.2.5- Observations et prise des données

Au cours du présent travail, les microtubercules sont identifiés à l'aide de critères morphologiques. Le terme de microtubercule est appliqué à toutes structures axillaires de forme arrondie ou cylindrique, bien définies par un épiderme montrant au moins un début de subérisation (écorce brunâtre et mate) et qui peuvent être facilement détachées de l'axe principal. Ces structures paraissent former une entité autonome et portent toujours des racines.

Pendant toute la durée de l'expérience, les cultures sont inspectées à intervalle de 4 semaines pour détecter l'apparition de microtubercules. Une fréquence¹ de tubérisation est alors déterminée pour chacune des conditions testées et son évolution est suivie tout au long de l'expérience. Cette variable est définie comme suit:

$$\text{Fr. de tubérisation} = \frac{\text{no. d'explantats portant au moins un microtubercule}}{\text{no. d'explantats mis en culture}}$$

Au moment de l'arrêt des expériences, une fréquence de réponse, est calculée pour chacune des conditions étudiées. Comme la micropropagation est un des objectifs du programme de recherche, les explantats n'ayant formé que des racines ou qu'une tige de taille nettement inférieure

¹ Tout au long du présent travail, le terme "fréquence" est utilisé dans le sens de "fréquence relative" telle que définie par Scherrer (1984).

à la normale et trop peu développée pour servir de source d'explantats (plantule de taille inférieure à 2 cm), ne sont pas considérés comme ayant répondu de façon satisfaisante à la culture. La fréquence de réponse est donc définie de la façon suivante:

$$\text{Fr. de réponse} = \frac{\text{no. d'explantats ayant répondu de façon satisfaisante à la culture}}{\text{no. d'explantats mis en culture}}$$

Les plantules sont ensuite disséquées afin d'en prélever les microtubercules. Ceux-ci sont dénombrés, mesurés (longueur et largeur à $\pm 0,5$ mm) à l'aide d'un vernier (modèle 15-100-500, compagnie Manostat) et pesés individuellement (poids frais à $\pm 0,5$ mg) à l'aide d'une balance digitale (modèle 1702MP8, compagnie Sartorius). Lorsque les microtubercules portent des racines ou des tiges, celles-ci sont éliminées avant la pesée.

Les trois variables estimées pour chacun des explantats ayant répondu à la culture, et qui sont utilisées pour évaluer la qualité de la tubérisation obtenue aux différentes conditions étudiées sont les suivantes:

$$\text{Rendement} = \frac{\text{poids cumulé de tous les microtubercules produits par un même explantat (en gramme)}}{\text{explantat}}$$

$$\text{Nombre de microtubercules} = \text{nombre total de microtubercules produits par un même explantat}$$

$$\text{Poids moyen des microtubercules} = \frac{\text{poids moyen des microtubercules produits par un même explantat}}{\text{explantat}}$$

2.2.6- Analyses statistiques des données recueillies

L'erreur-type ("standard error") est utilisée pour évaluer l'évolution des fréquences de tubérisation au cours de la culture, le nombre de réplicats disponibles pour ces mesures étant limité. Pour la même raison, les fréquences de réponses obtenues pour les diverses conditions étudiées sont comparées à l'aide de ce type d'analyse statistique.

Une analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification (photopériode et contenant) est utilisée pour détecter l'influence de ces paramètres sur la tubérisation *in vitro* et pour examiner

la possibilité d'une action synergique entre eux. Les variables dépendantes testées sont le rendement, le nombre et le poids moyen des microtubercules, et seules les valeurs recueillies sur des explantats ayant répondu de façon satisfaisante à la culture ont été utilisées pour cette analyse. Un test de comparaison multiple LSD ("Least significant difference"), modifié selon Milliken et Johnson (1984) pour tenir compte des effectifs de taille variable, est ensuite calculé pour comparer entre elles les diverses conditions de culture étudiées.

Une distribution de fréquence du poids des microtubercules pour chacune des photopériodes étudiées est établie en tenant compte de tous les microtubercules produits au cours de ce type d'expériences pour une même espèce ou cultivar. Les microtubercules sont regroupés en deux classes (petits et gros) dont la limite est établie en fonction du poids moyen des microtubercules de chacune des espèces.

Les diverses analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un micro-ordinateur de type Macintosh Plus, au moyen des logiciels STATVIEW et SYSTAT.

2.3- Plan des expériences

2.3.1- *D. abyssinica*

Pour cette espèce, les expériences ont été répétées trois fois. A chacune d'entre elles, 22 explantats (10 tubes et 3 boîtes) par photopériode ont été mis en culture. Les expériences ont été arrêtées après 23 à 24 semaines de culture.

2.3.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

Les expériences ont été répétées deux fois. La première fois, 26 explantats (10 tubes et 4 boîtes) ont été mis en culture pour chacune des photopériodes étudiées. La seconde expérience a été effectuée avec 44 explantats (20 tubes et 6 boîtes) par photopériode. Les expériences ont été arrêtées après 23 à 24 semaines de culture.

2.3.3- *D. alata* cv. 'Florida'

Les expériences ont été répétées quatre fois. Les deux premières fois, 22 explantats (10 tubes et 3 boîtes) ont été mis en culture pour chacune des photopériodes étudiées. Les deux dernières expériences n'ont été effectuées qu'avec une seule sorte de contenant, soit une fois avec 10 tubes (10 explantats) par photopériode et l'autre avec 4 boîtes (16 explantats) par photopériode (sauf en obscurité constante où seulement 3 boîtes (12 explantats) ont été utilisées). Les expériences ont été arrêtées après 23 à 25 semaines de culture.

3- Expériences sur l'influence de modifications de la composition minérale du milieu nutritif sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'

3.1- Objectifs

Ce type d'expériences est effectué pour déterminer l'influence de modifications de la composition minérale du milieu nutritif sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'. Les modifications étudiées concernent principalement les deux sources d'azote, bien qu'elles affectent aussi la source de potassium. En effet, un milieu témoin contenant les sels MS complets est comparé à un milieu sans NH_4NO_3 où l'ion ammonium est absent, et à un milieu sans KNO_3 où le rapport NO_3/NH_4 est égal à un et où la quantité de potassium disponible est réduite de façon importante.

3.2- Méthodologie

3.2.1- Milieux de culture

3.2.1.1- Composition des milieux de culture

Les milieux de culture comparés (tableau II) contiennent les sels mineurs et les vitamines du milieu MS, une faible concentration d'une auxine (0,5 mg/L de ANA), 40 g/L de saccharose et 7 g/L d'agar (Difco Bacto). Cependant, leur composition en sels majeurs diffère: alors que le milieu témoin comprend tous les sels majeurs selon MS, l'un des milieux modifiés ne contient pas la composante NH_4NO_3 et l'autre ne possède pas la composante KNO_3 .

3.2.1.2- Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture sont préparés de la façon décrite à la section 1.2.2. Cependant, comme une élimination sélective de la composante NH_4NO_3 ou KNO_3 est nécessaire dans les milieux modifiés, les sels MS ne proviennent pas du mélange commercial habituel. Des solutions individuelles de NH_4NO_3 et KNO_3 (concentrées 10 fois) sont préparées, ainsi qu'un mélange contenant tous les autres sels majeurs (concentré 5 fois). Pour les sels mineurs, une solution commerciale concentrée 100 fois ("MS micronutrients", compagnie Carolina) est employée. Ces solutions sont aussi utilisées pour préparer le milieu témoin.

3.2.2- Explantats mis en culture

Les explantats sont prélevés sur des cultures de réserve âgées de 23 semaines pour *D. abyssinica* et de 18 à 19 semaines pour *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'. Le type d'explantats utilisé est décrit à la section 2.2.3.

3.2.3- Conditions de culture

Les cultures sont conservées à une photopériode de 8 h dans les conditions décrites à la section 2.2.4.

3.2.4- Observations et prise de données

Les observations et la prise des données sont effectuées de la façon décrite à la section 2.2.5.

3.2.5- Analyses statistiques des données recueillies

Les analyses statistiques sont effectuées de la façon décrite à la section 2.2.6. Cependant, l'influence de modifications de la composition minérale du milieu nutritif sur la tubérisation *in vitro* est déterminée par une analyse de variance (ANOVA) à un critère de classification, correspondant aux divers types de milieux comparés. Les variables dépendantes testées sont le rendement, le nombre et le poids moyen des microtubercules. Un test de comparaison multiple LSD ("Least significant difference"), modifié selon Milliken et Johnson (1984) pour tenir compte des effectifs de taille variable, est ensuite calculé pour comparer les milieux modifiés au milieu témoin.

3.3- Plan des expériences

3.3.1- *D. abyssinica*

Pour cette espèce, l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, avec 20 explantats (5 boîtes) par condition du milieu. L'expérience a été arrêtée après 25 semaines de culture.

3.3.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

Les expériences ont été répétées deux fois, la première avec 20 explantats (5 boîtes) par condition du milieu, la seconde avec 40 explantats (10 boîtes) par condition. Dans les deux cas, elles ont été arrêtées après 25 semaines de culture.

3.3.3- D. alata cv. 'Florida'

Les expériences ont été répétées deux fois, chacune avec 20 explantats (5 boîtes) par condition du milieu. Dans les deux cas, elles ont été arrêtées après 24 à 25 semaines de culture.

4- Essais de germination *in vitro* des microtubercules de *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'

4.1- Objectifs

Ces essais ont pour but de déterminer si des microtubercules obtenus en culture *in vitro* peuvent germer et régénérer des plantules utilisables pour la micropropagation. Des essais de germination sont aussi effectués avec des microtubercules récoltés et conservés quelques semaines avant d'être mis en culture, pour vérifier si la conservation affecte la capacité de germination.

4.2- Méthodologie

4.2.1- Milieu de culture

Le milieu utilisé ne contient aucune hormone (tableau II). Il est composé des sels minéraux et les vitamines selon MS ainsi que de 30 g/L de saccharose et de 7 g/L d'agar (Difco Bacto). Il est préparé de la façon décrite à la section 1.2.2 mais est autoclavé avant d'être réparti dans des pétris de plastique stériles de 100 mm X 16 mm, à raison de 20 ml par pétri.

4.2.2- Explantats mis en culture

Les microtubercules sont prélevés sur des cultures de réserve âgées de 23 à 24 semaines chez *D. abyssinica* et de 17 à 19 semaines chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'. Lorsqu'ils portent des racines ou des tiges, celles-ci sont disséquées et éliminées au moment du prélèvement.

Certaines récoltes de microtubercules sont déposées en pétris stériles, qui sont laissés plusieurs heures non scellés sous une hotte à flux laminaire pour empêcher la condensation. Puis ils sont fermés avec du parafilm et conservés quelques semaines en éclairage réduit (200 lux fournis de façon indirecte par des tubes fluorescents de type " F40 Cool White") dans la salle de culture de l'Institut botanique. Les conditions régnant dans celle-ci sont décrites à la section 2.2.4. Aucun microtubercule de moins de 2 mm n'a été conservé en raison de leur déshydratation rapide.

Les microtubercules frais et conservés qui sont mis à germer proviennent donc de récoltes distinctes mais ils sont semés le même jour. Ils sont disposés à la surface du milieu de germination, séparés les uns des autres par une distance d'environ 1 cm. Au moment de leur mise en culture, ces microtubercules sont regroupés en catégories (décrites plus loin au tableau III) qui sont définies à l'aide de la longueur des microtubercules. Les raisons du choix de ce critère sont expliquées à la section 3.1 des Résultats.

4.2.3- Conditions de culture

Les cultures sont conservées à une photopériode de 16 h dans la salle de culture de l'Institut botanique. Les conditions régnant dans celle-ci sont décrites à la section 2.2.4.

4.2.4- Observations et prise de données

Les observations sont effectuées à la fin des essais. Le pouvoir de germination des diverses catégories de microtubercules est alors

estimé par la fréquence de germination, évaluée de la façon suivante:

$$\text{Fr. de germination} = \frac{\text{no. de microtubercules ayant produit au moins une tige}}{\text{no. de microtubercules mis en culture}}$$

Le nombre de tiges produites par microtubercule est aussi déterminé. Il se définit de la façon suivante:

$$\text{Nombre de tiges produites par microtubercule} = \frac{\text{no. de tiges normales produites par un même microtubercule}}{\text{microtubercule}}$$

4.2.5- Analyses statistiques des données recueillies

L'erreur-type ("standard error") est utilisée pour comparer le nombre de tiges produites par microtubercule pour chacune des différentes catégories étudiées. Ces analyses statistiques sont calculées à l'aide d'un micro-ordinateur de type Macintosh Plus, au moyen du logiciel STATVIEW. Aucune analyse statistique n'est effectuée pour comparer la fréquence de germination des différentes catégories de microtubercules, les essais de germination n'ayant été faits qu'une seule fois.

4.3- Plan des expériences

4.3.1- *D. abyssinica*

Chez cette espèce, un seul essai de germination de microtubercules frais et conservés a été effectué. Les microtubercules conservés ont été gardés 10 semaines après leur récolte avant d'être mis en culture. Le nombre de microtubercules mis en culture pour chacune des catégories est indiqué au tableau III. L'essai a été arrêté après 13 semaines de culture.

4.3.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

Chez ce cultivar, un seul essai de germination a été effectué pour des microtubercules frais et aucun n'a été fait avec des microtubercules conservés. Le nombre de microtubercules mis en culture pour chacune des catégories est indiqué au tableau III. L'essai a été arrêté après 13 semaines de culture.

Tableau III. Effectifs mis en culture pour chaque catégorie de microtubercules lors d'essais de germination *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.

Espèces	Catégorie		Nombre de microtubercules mis en culture	
	#	limites ¹	frais	après conservation
<i>D. abyssinica</i>	1	moins de 2 mm	5	-
	2	2 à 4 mm	10	24
	3	4 à 6 mm	10	23
	4	6 à 8 mm	8	14
	5	8 à 10 mm	8	24
	6	10 mm et plus	14	16
<i>D. alata</i> cv. 'Brazo fuerte'	1	moins de 2 mm	9	-
	2	2 à 4 mm	22	-
	3	4 à 6 mm	11	-
	4	6 à 8 mm	7	-
	5	8 mm et plus	2	-
<i>D. alata</i> cv. 'Florido'	1	moins de 2 mm	13	-
	2	2 à 4 mm	26	19
	3	4 à 6 mm	22	8
	4	6 mm et plus	5	4

¹ Limite inférieure incluse

4.3.3- *D. alata* cv. 'Florida'

Un seul essai de germination de microtubercules frais et conservés a été effectué. Les microtubercules conservés ont été gardés 5 semaines après leur récolte avant d'être mis en culture. Le nombre de microtubercules mis en culture pour chacune des catégories est indiqué au tableau III. L'essai a été arrêté après 13 semaines de culture.

5- Expériences sur la capacité de germination de fragments de microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

5.1- Objectifs

Le but de cette expérience est de déterminer s'il est possible d'accroître le nombre de tiges pouvant être régénérées à partir d'un même microtubercule en fragmentant ce dernier.

5.2- Méthodologie

5.2.1- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour cette expérience est identique à celui employé pour les essais de germination de microtubercules entiers, décrit à la section 4.2.1.

5.2.2- Explantats mis en culture

Les microtubercules proviennent de cultures de réserve âgées de 19 à 24 semaines. Lorsqu'ils portent des racines ou des tiges, celles-ci sont disséquées et éliminées au moment du prélèvement.

Les microtubercules sont ensuite séparés en plusieurs catégories décrites au tableau IV, puis découpés en un certain nombre de fragments de la façon suivante:

- les microtubercules de première et deuxième catégorie ainsi qu'une partie de ceux de troisième catégorie, sont coupés transversalement pour former deux fragments.
- certains des microtubercules de quatrième catégorie et tous ceux de cinquième catégorie sont coupés transversalement en tranches d'environ 2 mm, formant ainsi trois tranches dans le premier cas, et quatre ou plus dans le second.
- certains microtubercules de troisième et quatrième catégorie sont coupés à la fois transversalement et longitudinalement pour former quatre fragments dans le premier cas, et six dans le second.

Lors de la mise en culture, les fragments de microtubercules sont déposés à la surface du milieu, séparés les uns des autres par une distance d'environ 1 cm.

5.2.3- Conditions de culture

Les conditions de culture utilisées pour cette expérience sont identiques à celles employées pour les essais de germination de microtubercules entiers, décrites à la section 4.2.3.

5.2.4- Observations et prise de données

Les observations sont effectuées à la fin des expériences. Le pouvoir de germination des microtubercules tranchés est estimé par la fréquence de germination, qui est évaluée de la façon suivante:

$$\text{Fr. de germination} = \frac{\text{no. de microtubercules dont au moins un fragment a produit une tige ou plus}}{\text{no. de microtubercules mis en culture}}$$

Tableau IV. Effectifs mis en culture pour chaque catégorie de fragments de microtubercules lors d'essais de germination *in vitro* chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.

		Nombre de microtubercules mis en culture					
		1 ^e exp.		2 ^e exp.		3 ^e exp.	
catégorie		coupure		coupure		coupure	
#	limites ¹	T ²	T&L ³	T	T&L	T	T&L
1	moins de 2 mm	0	-	5	-	5	-
2	2 à 4 mm	8	-	19	-	9	-
3	4 à 6 mm	4	2	13	11	7	6
4	6 à 8 mm	0	0	4	3	3	3
5	8 mm et plus	0	-	2	-	0	-

¹ Limite inférieure incluse

² T : coupures transversales

³ T&L : coupures transversales et longitudinales

Le nombre total de tiges produites par microtubercule est aussi déterminé. Il est défini de la façon suivante:

No. total de tiges produites par microtubercule = somme des tiges normales produites par tous les fragments d'un même microtubercule

5.2.5- Analyses statistiques des données recueillies

L'erreur-type ("standard error") est utilisée pour comparer les résultats (fréquence de germination et nombre total de tiges produites par microtubercule) obtenus pour les différentes catégories étudiées. Ces analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un micro-ordinateur de type Macintosh Plus, au moyen du logiciel STATVIEW.

5.3- Plan des expériences

Cette expérience n'a été effectuée que chez *D. glabra* cv. 'Brazo fuerte' où elle a été répétée trois fois. Le nombre de microtubercules mis en culture pour chacune des catégories est résumé au tableau IV. Les expériences ont été arrêtées après 13 semaines de culture.

RESULTATS

1- Influence de divers paramètres sur l'évolution des explantats de *D. abyssinica*, *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida' en culture *in vitro*

1.1- Description de l'évolution des explantats mis en culture

1.1.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés

1.1.1.1- Développement de l'appareil caulinaire

Les bourgeons des explantats mis en culture ne forment habituellement qu'une seule tige, dont les feuilles sont cordées dès les premiers noeuds alors qu'en général chez les plantes produites en serre, de nombreuses cataphylles se développent avant l'apparition des feuilles normales (Degas, 1986). Les tiges produites *in vitro* sont non-volubiles et ont une allure un peu en zig-zag, la position des feuilles alternant à chaque noeud. Bien que *in vivo* chez *D. alata* la présence d'ailes sur les tiges et les pétioles soit un caractère taxonomique important, de telles structures ne sont que très rarement observées sur nos vitroplants.

L'appareil caulinaire se ramifie fréquemment, cependant la formation de multiples tigelles à l'aisselle d'une même feuille est assez rare. En effet, un seul bourgeon axillaire paraît habituellement se développer, produisant soit une ramification (avec souvent des racines à sa base), soit un microtubercule qui porte à la fois des tiges et des racines. Dans ce dernier cas, nos observations n'ont pas permis de déterminer si la structure initiale consistait en une ramification qui a développé à sa base un microtubercule ou s'il s'agissait au contraire d'un microtubercule qui a par la suite formé une tige.

Vers la fin de la culture, les plantules montrent des signes de sénescence. On assiste d'abord au dépérissement des feuilles les plus

âgées qui perdent graduellement leur coloration, devenant brunes et parfois translucides. Ce phénomène peut ensuite s'étendre à l'ensemble de la plantule.

1.1.1.2- Développement de l'appareil racinaire

Les bourgeons des noeuds mis en culture ne forment en général qu'une à trois racines qui développent cependant de nombreuses ramifications, particulièrement dans la région située autour de l'explantat. Puis au cours de la culture, de nouvelles racines apparaissent au niveau de certains bourgeons axillaires de la plantule ainsi que sur les microtubercules.

1.1.1.3- Développement des microtubercules

L'apparition des premiers microtubercules est observée entre la 8^e et la 12^e semaine de culture. Ils se développent dans la région inférieure de la plantule, directement à la base de la tige produite par l'explantat ou à l'aisselle d'une des feuilles les plus âgées. Des microtubercules se forment ensuite au niveau de divers bourgeons axillaires de la plantule, sur les tiges principales comme sur leurs ramifications.

La chair des microtubercules est plutôt blanchâtre. L'épiderme, qui est lisse et luisant au début de leur formation, se recouvre rapidement d'une écorce brune et mate, sauf dans la partie distale encore en croissance. Un seul microtubercule est habituellement observé à l'aisselle de chaque feuille et il est de forme ovoïde ou cylindrique, quelquefois digitée ou polylobée. Ces derniers proviennent peut-être de la fusion de plusieurs microtubercules distincts formés à l'aisselle d'une même feuille ou à des noeuds contiguës. Cependant des observations plus poussées seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Les microtubercules portent toujours plusieurs racines, réparties assez uniformément sur l'ensemble de leur surface (la partie distale n'en porte cependant pas) et produisent fréquemment quelques tiges dans leur portion proximale. Celles-ci ont un développement comparable à celui de tiges produites directement par un bourgeon axillaire.

1.1.1.4- Survie et qualité de la réponse des explantats

Bien que la survie et la qualité de la réponse des explantats varient selon les espèces et les conditions de culture employées, un certain brunissement du milieu nutritif est observé autour de presque tous les explantats. Ce phénomène ne paraît toutefois affecter ni leur survie, ni la qualité de leur réponse à la culture.

1.1.2- Caractéristiques particulières à un génotype

1.1.2.1- *D. abyssinica*

Les plantules de *D. abyssinica* se distinguent par un appareil caulinaire de couleur verdâtre, parfois légèrement teinté de rouge. Bien qu'elles aient une apparence normale dans la plupart des conditions de culture étudiées, le milieu nutritif employé n'est probablement pas optimal.

En effet, chez cette espèce, les racines qui s'enfoncent dans le milieu de culture ont tendance à épaissir et paraissent devenir friables. L'appareil racinaire se transforme alors graduellement en un amas compact composé d'un mélange de cal et de racines épaissies. Quelques expériences préliminaires ont permis de constater que ce phénomène est lié à la présence de ANA dans le milieu nutritif (figure 2 A). Ce cal ne provient pas directement de l'explantat mis en culture mais paraît plutôt formé par une prolifération anarchique de certains méristèmes racinaires (figure 2 B). Cette transformation débute habituellement entre la 8^e et la 12^e semaine de culture, rendant difficile l'observation de la formation et du développement des microtubercules apparaissant près de la base de l'explantat.

1.1.2.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

Ce cultivar se distingue par son appareil caulinaire fortement anthocyané. L'épiderme des tiges, des pétioles ainsi que des microtubercules est pourpre. Le limbe des très jeunes feuilles est aussi plutôt

Figure 2. Effets du ANA sur le système racinaire des plantules de *D. abyssinica* et de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.

A- Modifications de l'aspect du système racinaire de plantules de *D. abyssinica* lors d'un accroissement de la concentration en ANA. (barre = 1 cm)

De gauche à droite, concentrations en ANA de 0 mg/L, 0,005 mg/L, 0,05 mg/L, 0,5 mg/L et 5 mg/L.
(Cultures effectuées en photopériode de 8 h)

B- Début de formation de cal sur le système racinaire de *D. abyssinica*. (barre = 0,5 cm)

C- Racines anormales observées chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.
(barre = 0,5 cm)

rougeâtre, bien que les feuilles matures soient complètement vertes. D'ailleurs, toutes les structures caulinaires matures sont habituellement d'une teinte verte.

Le système racinaire de ce cultivar ne forme jamais de cal. Cependant, la présence de racines boursouflées ou épaissies, parfois teintées de rose, est quelquefois observée (figure 2 C).

1.1.2.3- *D. alata* cv. 'Florida'

Chez ce cultivar, la présence d'anthocyanes reste localisée dans le premier entrenoeud formé ainsi que sur de courtes portions de tiges et de pétioles adjacentes à certains noeuds jeunes. La partie centrale du limbe de jeunes feuilles est parfois teintée de pourpre, mais les feuilles matures sont complètement vertes, tout comme le reste de l'appareil caulaire et l'épiderme des microtubercules. 'Florida' se distingue aussi par ses feuilles moins fortement cordées et ses entrenoeuds plus courts.

L'évolution des bourgeons axillaires paraît plus complexe chez ce cultivar que chez les deux autres génotypes étudiés. En effet, la formation de multiples tigelles à l'aisselle d'une même feuille y est plus fréquente et lorsque ce phénomène se produit, on observe souvent la présence côte à côte d'une tigelle et d'une structure gonflée qui porte plusieurs débuts de tiges. Suivant la convention utilisée pour le présent travail (décrite à la section 2.2.5 du Matériel et Méthodes), cette structure est considérée comme un microtubercule dès qu'elle porte un début d'écorce. Plus tard au cours de leur développement, les différentes pièces produites à l'aisselle d'une même feuille fusionnent plus ou moins entre elles, prenant ainsi l'apparence classique d'un microtubercule ayant produit plusieurs tiges.

Enfin, aucune des déformations du système racinaire remarquées chez les autres génotypes étudiés (formation de cal, de racines boursouflées) n'est observée chez 'Florida'. Cependant, les premières racines formées par les explantats sont souvent un peu plus épaisses et plus oxydées que les autres. Elles paraissent parfois avoir de la difficulté à s'enfoncer dans l'agar, l'explantat étant alors expulsé progressivement

hors du milieu de culture. Lorsque ce phénomène se produisait, l'explantat était réinséré dans sa position initiale afin de permettre aux plantules de poursuivre un développement normal.

1.2- Influence de la photopériode sur l'évolution des explantats

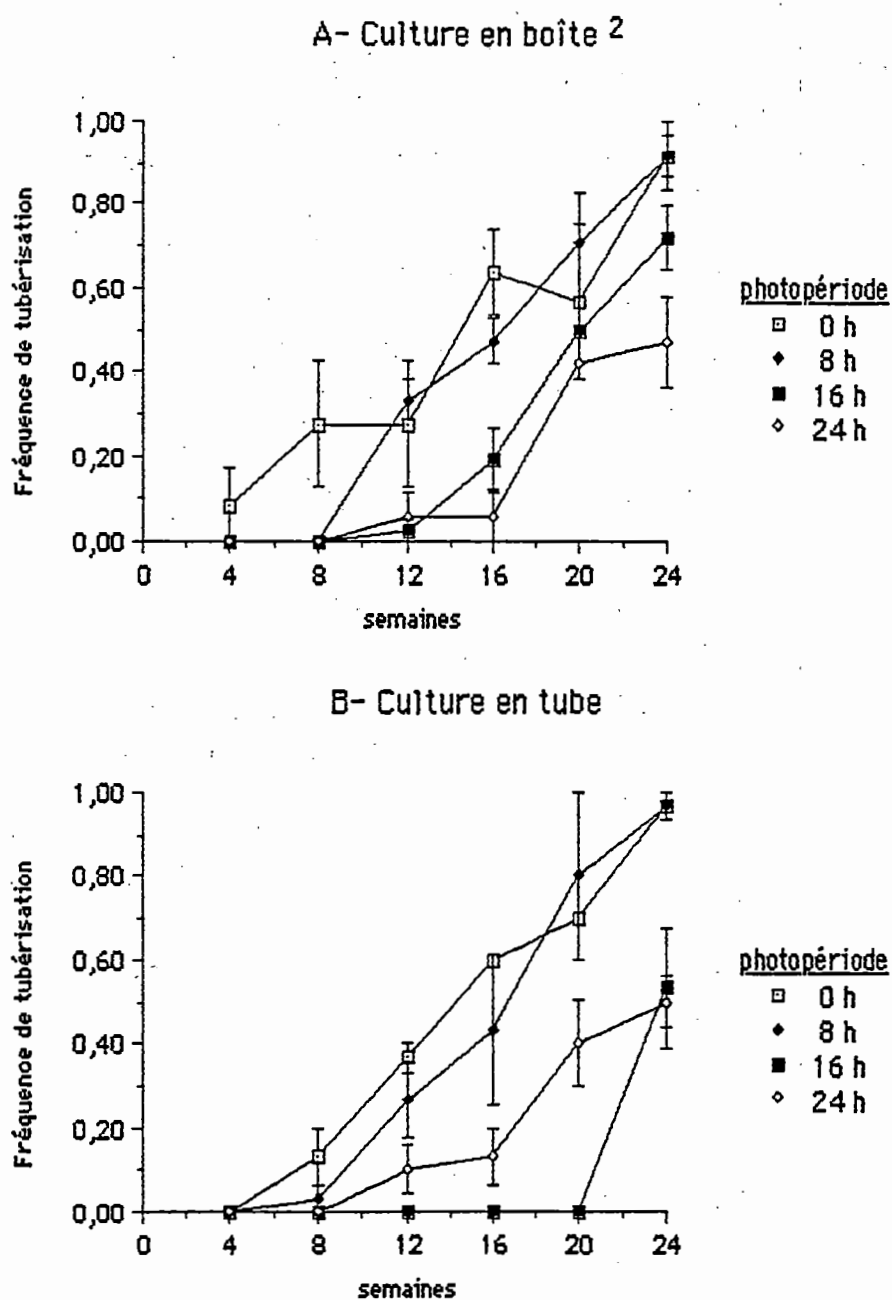
1.2.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés

Bien que l'influence exercée par la photopériode sur le développement des plantules varie selon le génotype considéré, dans tous les cas les explantats conservés en obscurité constante (photopériode de 0 h) produisent des plantules nettement étiolées, aux feuilles minuscules et jaunâtres. Elles ne sont habituellement composées que d'une seule tige complètement blanche (sauf chez le cultivar 'Brazo fuerte' où elle est souvent teintée de rose) qui ne comporte que peu de noeuds et se ramifie rarement. L'épiderme des microtubercules formés à l'obscurité est blanchâtre et l'écorce qui le recouvre par la suite reste assez pâle.

Chez les trois génotypes étudiés, les premiers microtubercules apparaissent habituellement entre la 8^e et la 12^e semaine de culture (figures 3, 4 et 5), puis le nombre d'explantats ayant tubérisé augmente régulièrement au cours de l'expérience. La tendance observée semble indiquer que dans des conditions favorables, presque tous les explantats ayant répondu à la culture pourraient produire des microtubercules si l'expérience était poursuivie suffisamment longtemps.

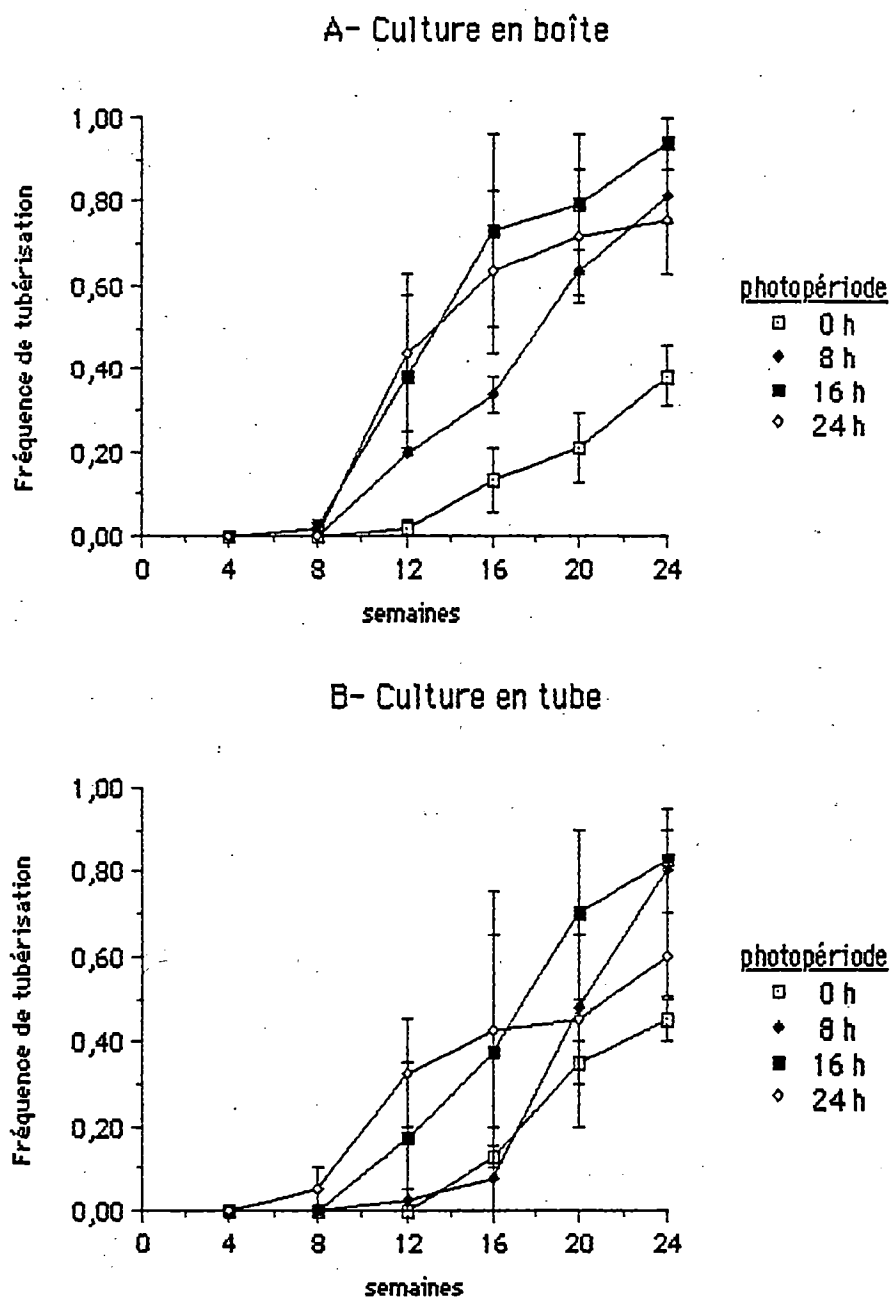
Cependant, les conditions défavorables à la tubérisation ne paraissent pas être les mêmes chez les deux espèces comparées. En effet, chez *D. abyssinica*, les fréquences de tubérisation observées en photopériodes de 16 h et 24 h sont habituellement inférieures à celles obtenues aux autres conditions étudiées (figure 3). Or chez les deux cultivars de *D. alata* (figures 4 et 5), une telle diminution s'observe plutôt chez les plantules conservées à l'obscurité bien que, en ce qui concerne les cultures en tube de 'Brazo fuerte', les résultats obtenus à cette photopériode ne soient pas significativement différents de ceux notés pour les trois autres.

Figure 3. Influence de la photopériode et du type de contenant sur l'évolution de la tubérisation chez *D. abyssinica*.¹



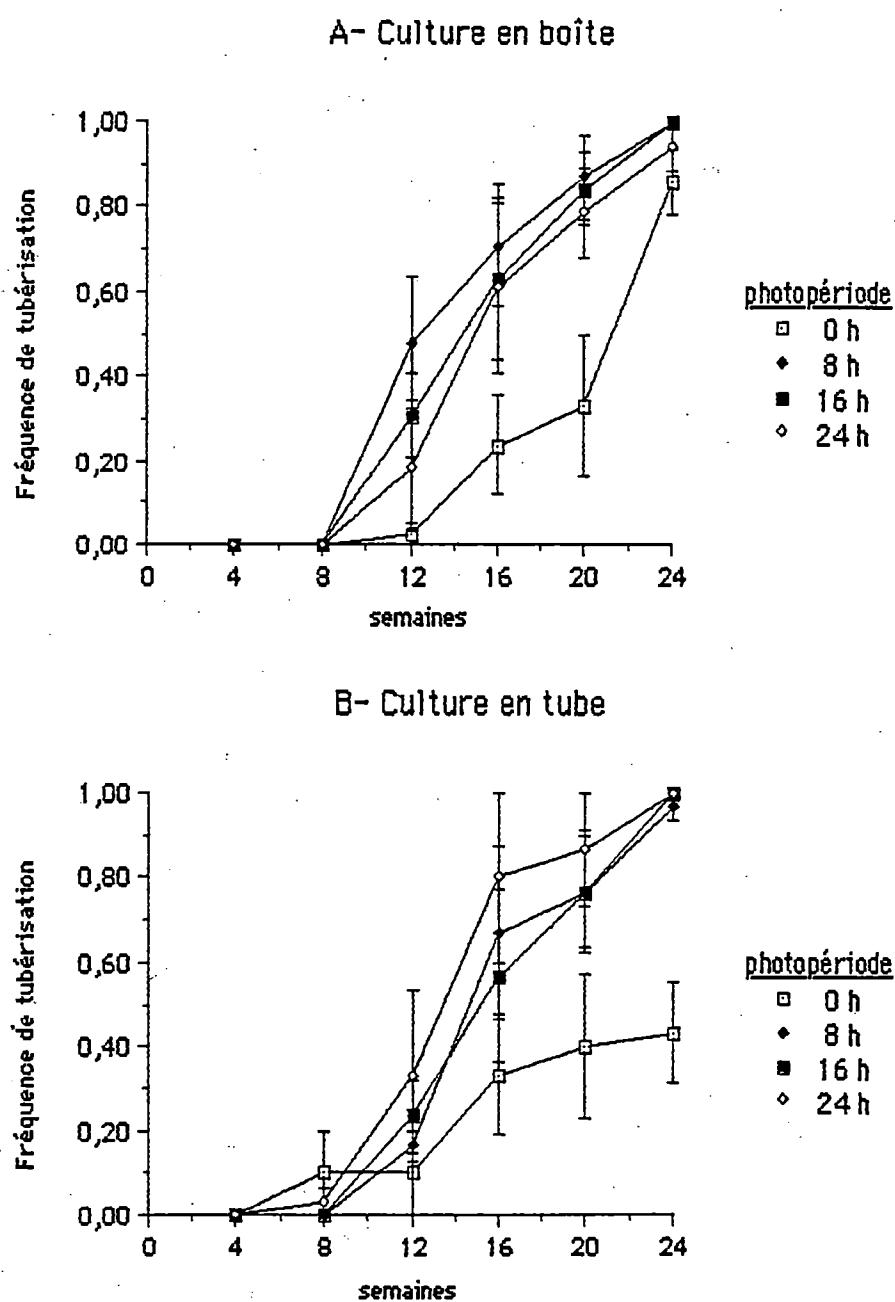
- ¹ Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.
- ² La diminution de la fréquence notée à la 20^e semaine de culture à l'obscurité provient d'une réduction de l'effectif causée par l'apparition de contaminations dans un contenant.

Figure 4. Influence de la photopériode et du type de contenant sur l'évolution de la tubérisation chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.¹



¹ Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

Figure 5. Influence de la photopériode et du type de contenant sur l'évolution de la tubérisation chez *D. alata* cv. 'Florida'.¹



¹ Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

Rappelons toutefois que la fréquence de tubérisation est évaluée en fonction du nombre total d'explantats mis en culture. Or les conditions jugées défavorables à la tubérisation étant aussi celles qui nuisent à la survie et à la réponse des explantats de l'espèce concernée (sections 1.2.2.1.4 et 1.2.2.2.4), il serait sans doute utile d'effectuer d'autres observations pour confirmer l'exactitude des résultats observés.

1.2.2- Caractéristiques particulières à une espèce

1.2.2.1- *D. abyssinica*

1.2.2.1.1- Développement de l'appareil caulinaire

Le développement de l'appareil caulinaire varie selon la photopériode employée (figure 6 A). Bien que la plupart des explantats conservés à l'obscurité (photopériode de 0 h) forment une grande tige étiolée, certains d'entre eux se contentent de produire un microtubercule de bonne taille et un système racinaire bien développé sans former de tiges.

Les explantats cultivés à une photopériode de 8 h forment généralement des plantules vigoureuses et en bonne santé, contrairement à celles produites en photopériode de 16 h ou en éclairage constant (photopériode de 24 h) qui ont souvent un développement anormal. En effet, alors que les plantules atteignent habituellement une taille de 4 à 6 cm, plusieurs de celles soumises à de longues photopériodes restent très petites (moins de 2 cm) et ne forment qu'un système racinaire peu développé. D'autres, qui atteignent pourtant une taille normale, portent des feuilles coriaces, quelquefois non cordées, d'une couleur rouge-brunâtre très foncée, parfois même violacée.

1.2.2.1.2- Développement de l'appareil racinaire

Le développement de l'appareil racinaire (racines et cal) ne paraît pas influencé par la photopériode utilisée.

Figure 6. Influence de la photopériode sur le développement des plantules de *D. abyssinica*¹

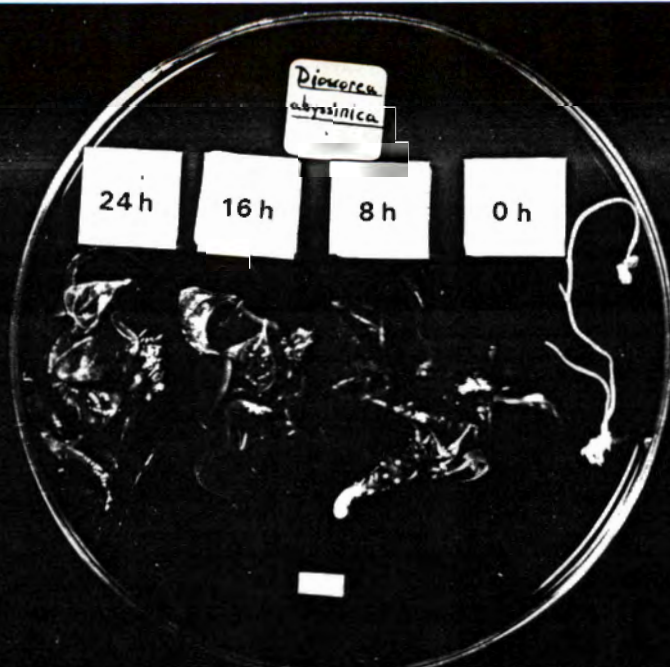
A- Comparaison de l'aspect de plantules produites aux différentes photopériodes étudiées. (barre = 1 cm)

B- Comparaison de l'aspect de microtubercules produits aux différentes photopériodes étudiées. (barre = 1 cm)

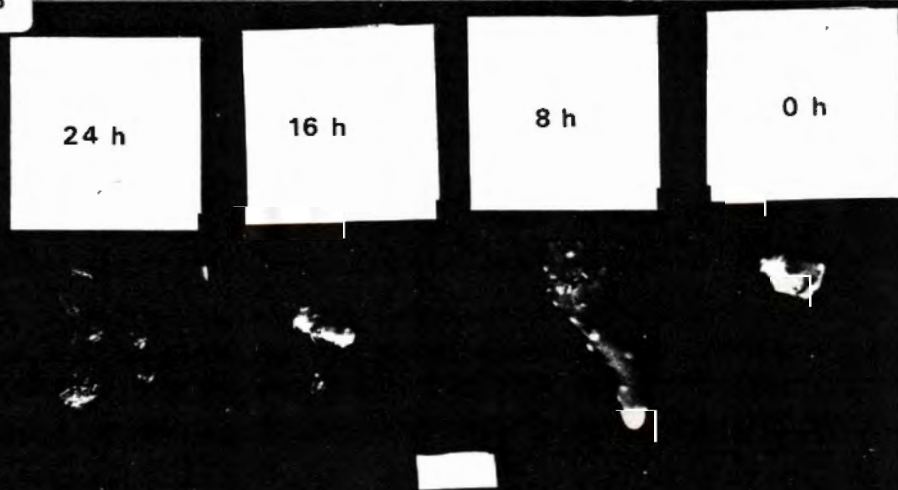
(Récolte de microtubercules pour une plantule par photopériode)

¹ Les symboles 24 h, 16 h, 8 h ou 0 h représentent la durée de la photopériode employée. Le système racinaire, de même que les tiges si présentes sur les microtubercules de la figure B, ont été éliminés pour permettre une meilleure visualisation des diverses structures.

6 A



6 B



1.2.2.1.3- Développement des microtubercules

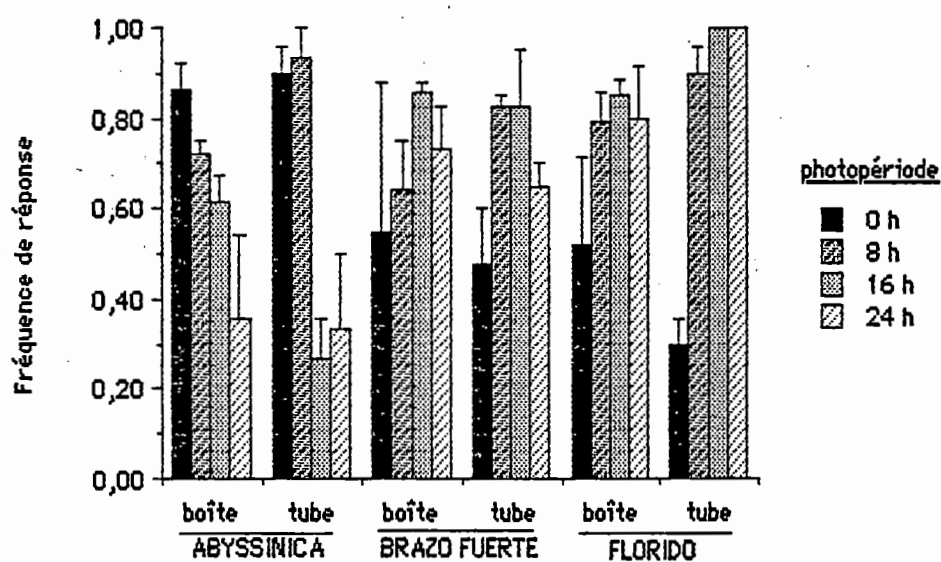
L'aspect des microtubercules paraît en général peu affecté par les conditions de culture employées. Toutefois, les microtubercules formés en photopériode de 8 h sont souvent très longs et parfois partiellement spiralés (figure 6 B).

1.2.2.1.4- Survie et qualité de la réponse des explantats

Ce travail étant axé sur la micropropagation, la qualité de la réponse des explantats est aussi importante que leur survie à la mise en culture. C'est pourquoi, selon la convention décrite à la section 2.2.5 du Matériel et Méthodes, les explantats cultivés en éclairage constant ou en photopériode de 16 h qui n'ont produit que des plantules de taille réduite au système racinaire peu développé, ne sont pas considérés comme ayant répondu de façon satisfaisante à la culture et ce, même si elles portent parfois de petits microtubercules. Cependant, les explantats conservés à l'obscurité qui ont produit un microtubercule de bonne taille sans toutefois former de tiges, sont considérés comme ayant répondu de façon satisfaisante parce que le système racinaire très bien développé de ces derniers permet de supposer qu'ils pourraient survivre à l'acclimatation et germer normalement.

Chez cette espèce, les explantats répondent mieux à la culture à l'obscurité ou en photopériode de 8 h qu'à des photopériodes de 16 h ou 24 h (figure 7). En effet lors de cultures en boîte, une augmentation de la photopériode est associée à une diminution graduelle de la fréquence de réponse. De même en tube, la fréquence de réponse observée aux photopériodes de 16 h et 24 h (éclairage constant) est de beaucoup inférieure à celle notée pour les deux autres conditions étudiées.

Figure 7. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la réponse des explantats de *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.¹



¹ Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

1.2.2.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'

1.2.2.2.1- Développement de l'appareil caulinaire

La photopériode exerce une influence similaire sur le développement de l'appareil caulinaire des deux cultivars de *D. alata* (figure 8 A et B). Les plantules conservées en obscurité constante (photopériode de 0 h), bien que composées de peu de noeuds, deviennent souvent très grandes (de 15 à 30 cm chez 'Brazo fuerte', de 8 à 12 cm chez 'Florida') grâce à leurs longs entrenoeuds.

Les plantules formées en photopériode de 8 h sont vigoureuses et en bonne santé mais demeurent nettement moins développées et ramifiées que celles exposées à des photopériodes de 16 h et 24 h. En effet, les bourgeons axillaires de la partie supérieure de ces dernières forment parfois de multiples tigelles à l'aisselle d'une même feuille, particulièrement chez 'Florida'. Cependant, les plantules soumises à de longues photopériodes, surtout celles conservées sous un éclairage constant (photopériode de 24 h) sont d'apparence plus sénesciente que les autres au moment de l'arrêt de l'expérience.

1.2.2.2.2- Développement de l'appareil racinaire

L'appareil racinaire réagit de façon similaire chez les deux cultivars étudiés. A l'obscurité il reste assez peu développé, les plantules ne formant que peu ou pas de racines sur les microtubercules et sur les noeuds aériens. Le système racinaire des plantules cultivées en photopériode de 8 h se concentre principalement dans la zone située autour de l'explantat, alors qu'aux photopériodes plus longues (16 h et 24 h) il envahit tout le milieu de culture. De plus, à ces deux photopériodes, les racines formées dans la portion supérieure de la plantule sont longues et très abondantes, ce qui rend souvent difficile la détection des microtubercules produits dans cette région.

Figure 8. Influence de la photopériode sur le développement des plantules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.¹

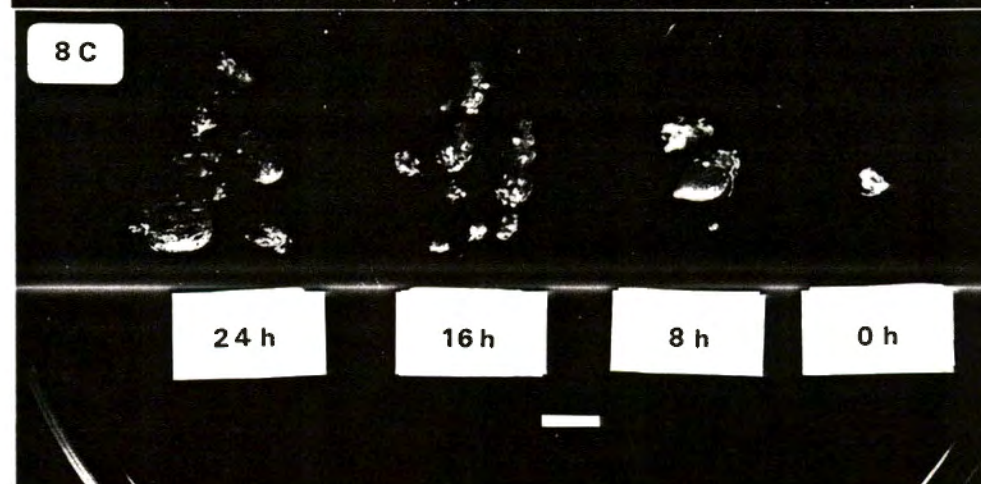
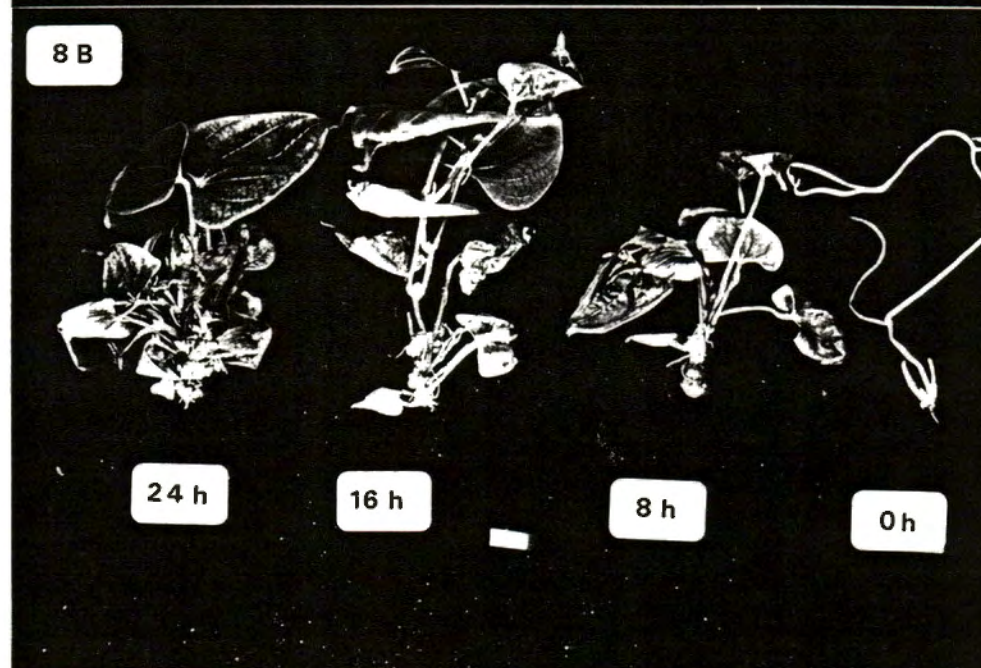
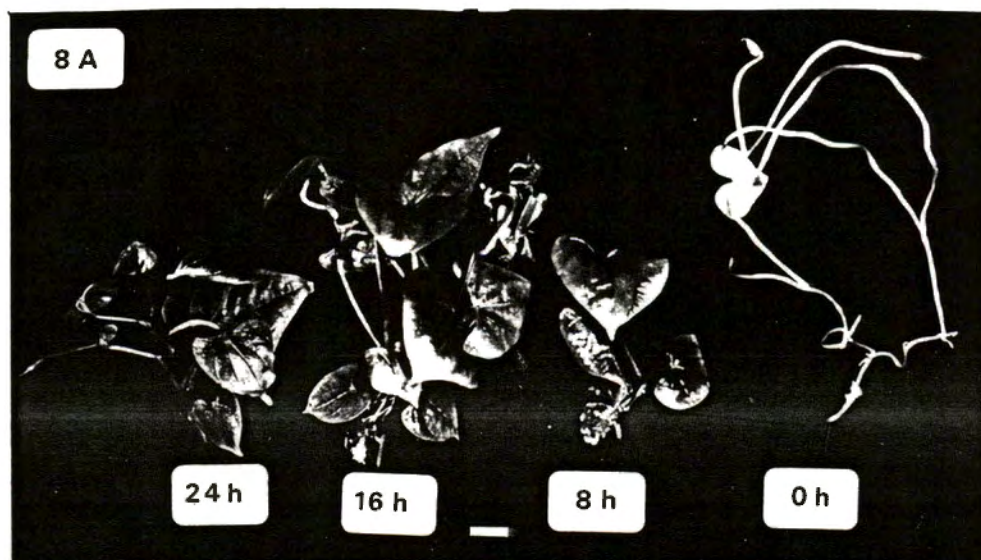
A- Comparaison de l'aspect de plantules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' produites aux différentes photopériodes étudiées.
(barre = 1 cm)

B- Comparaison de l'aspect de plantules de *D. alata* cv. 'Florido' produites aux différentes photopériodes étudiées.
(barre = 1 cm)

C- Comparaison de l'aspect des microtubercules produits *D. alata* cv. 'Florido' aux différentes photopériodes étudiées.
(barre = 1 cm)

(Récolte de microtubercules pour une plantule
par photopériode)

¹ Les symboles 24 h, 16 h, 8 h ou 0 h représentent la durée de la photopériode employée. Le système racinaire, de même que les tiges si présentes sur les microtubercules de la figure C, ont été éliminés pour permettre une meilleure visualisation des diverses structures.



1.2.2.2.3- Développement des microtubercules

L'aspect des microtubercules est en général peu affecté par les conditions de culture étudiées. Cependant, l'écorce des microtubercules produits en photopériode de 8 h paraît plus verdâtre que celle de ceux formés aux deux autres photopériodes (figure 8 C).

1.2.2.2.4- Survie et qualité de la réponse des explantats

Chez 'Florida', la fréquence de réponse des explantats cultivés à l'obscurité est inférieure à celles observées aux autres photopériodes (figure 7). Chez 'Brazo fuerte' aussi, cette fréquence paraît moins élevée que les autres (figure 7), bien que la diminution notée ne soit pas significative chez les cultures effectuées en boîte. Cependant, alors que chez 'Florida' les photopériodes de 8 h, 16 h et 24 h donnent des résultats similaires (figure 7), chez 'Brazo fuerte' les fréquences de réponse observées aux photopériode de 16 h (en boîte) ou de 8 h et de 16 h (en tube) paraissent meilleures que celles obtenues avec un éclairage constant.

1.3- Influence du contenant de culture sur l'évolution des explantats

Chez *D. abyssinica* et chez *D. alata* cv. 'Florida', les variations observées entre les diverses photopériodes étudiées paraissent en général plus marquées chez les cultures en tube que chez celles effectuées en boîte (figures 3, 5 et 7). De plus chez 'Florida', les fréquences de réponse observées en tube sont souvent légèrement supérieure à celles obtenues en boîte (figure 7). Chez 'Brazo fuerte' par contre, les variations de fréquence de tubérisation les plus marquées sont celles détectées en boîte (figure 4) et, malgré quelques différences ponctuelles, la réponse des explantats paraît peu affectée par le contenant de culture utilisé (figure 7).

Cependant, les plantules produites en tube sont particulièrement difficile à observer au cours de la culture. En effet, elles restent souvent recroquevillées, entassées dans la partie inférieure du contenant contrairement à celles formées en boîte qui ont une apparence plus dégagée,

utilisant si nécessaire toute la hauteur disponible. De plus, le limbe de nombreuses feuilles est d'une taille supérieure au diamètre du tube, masquant ainsi une partie de la plantule à l'observateur. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'évolution de la tubérisation paraît être légèrement plus lente chez les cultures effectuées en tube (figures 3, 4 et 5), l'apparition des microtubercules y étant détectée plus difficilement.

1.4- Influence de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution des explantats

1.4.1- Caractéristiques communes aux trois géotypes étudiés

Les expériences ayant pour but de vérifier l'influence de la composition minérale ont été effectuées en boîte, en photopériode de 8 h. L'évolution des explantats du témoin présente donc les caractéristiques décrites aux sections précédentes pour de telles conditions de culture.

1.4.1.1- Développement de l'appareil caulinaire

Les deux modifications étudiées influencent de façon importante le développement de l'appareil caulinaire. Bien que leur effet varie légèrement selon le géotype considéré, l'absence de KNO_3 est dans tous les cas fortement néfaste (figures 9 A, 10 A et 11 A).

1.4.1.2- Développement de l'appareil racinaire

Les modifications étudiées n'affectent pas le développement de l'appareil racinaire (figures 9 A, 10 A et 11 A).

1.4.1.3- Développement des microtubercules

Les deux modifications étudiées affectent peu l'aspect des microtubercules. L'évolution de la tubérisation chez les explantats cultivés sur les milieux modifiés est similaire à celle observée chez le témoin (figures 12 et 13). Dans tous les cas les premiers microtubercules apparaissent entre la 8^e et la 12^e semaine et le nombre d'explantats ayant tubérisé augmente par la suite tout au long de l'expérience.

Figure 9. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des plantules de *D. abyssinica*.¹

A- Comparaison de l'aspect de plantules produites sur les trois milieux étudiés. (barre = 1 cm)

B- Comparaison de l'aspect des microtubercules produits par des plantules cultivées sur les trois milieux étudiés. (barre = 1 cm)

(Récoltes de microtubercules provenant de quatre plantules par milieu)

¹ Les symboles utilisés MS, -NH₄NO₃ et -KNO₃ représentent respectivement le témoin, le milieu sans NH₄NO₃ et le milieu sans KNO₃.

Le système racinaire, de même que les tiges si présentes sur les microtubercules de la figure B, ont été éliminés pour permettre une meilleure visualisation des diverses structures.

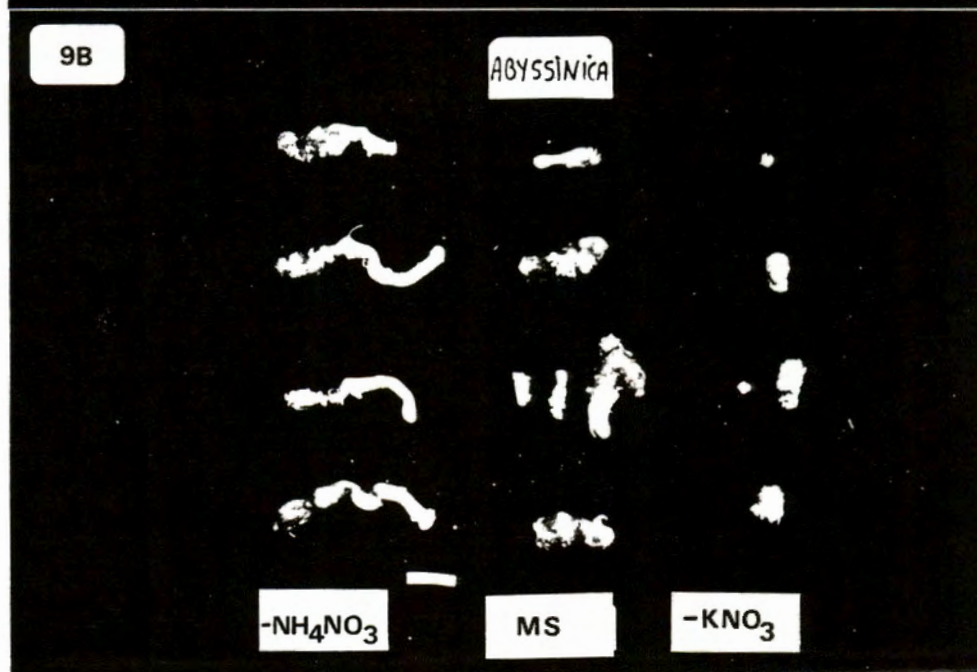
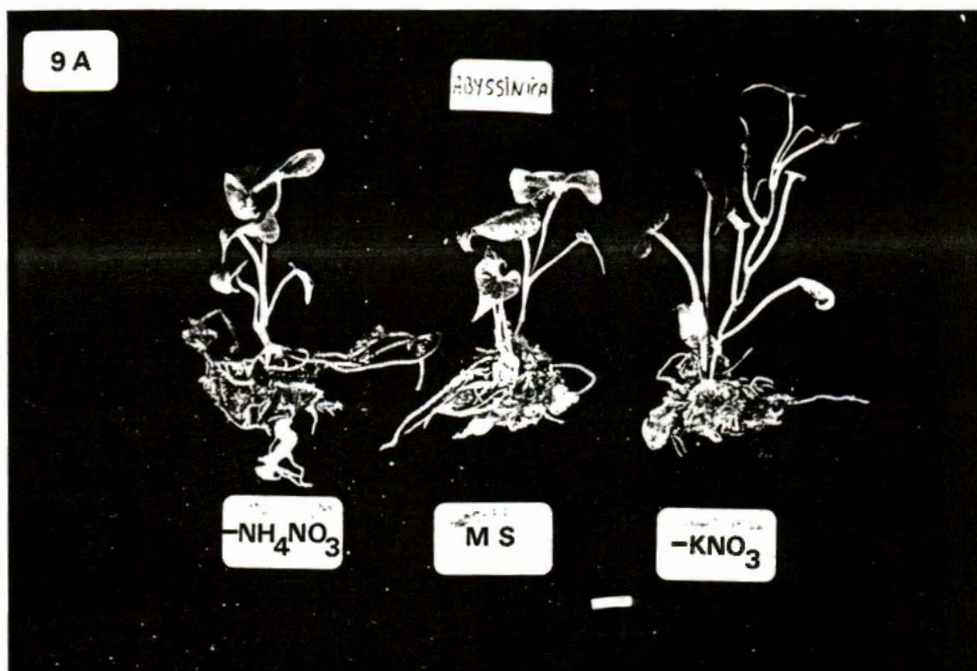


Figure 10. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des plantules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.¹

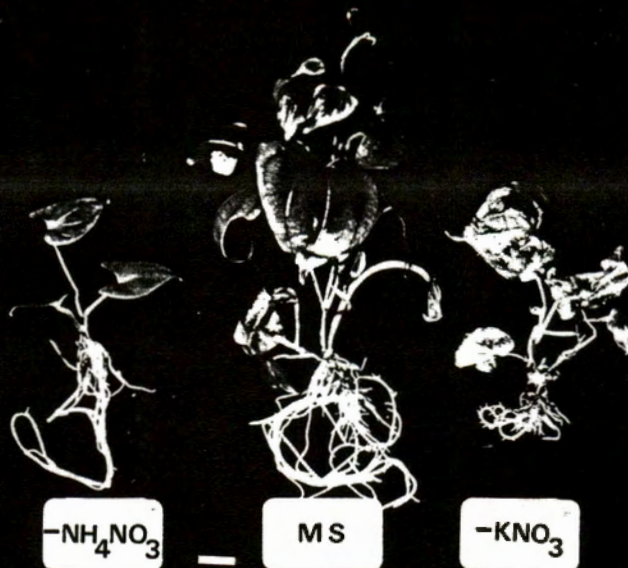
A- Comparaison de l'aspect de plantules produites sur les trois milieux étudiés. (barre = 1 cm)

B- Comparaison de l'aspect des microtubercules produits par des plantules cultivées sur les trois milieux étudiés. (barre = 1 cm)

(Récoltes de microtubercules provenant de quatre plantules par milieu)

¹ Les symboles utilisés MS, -NH₄NO₃ et -KNO₃ représentent respectivement le témoin, le milieu sans NH₄NO₃ et le milieu sans KNO₃. Le système racinaire, de même que les tiges si présentes sur les microtubercules de la figure B, ont été éliminés pour permettre une meilleure visualisation des diverses structures.

10A



10B

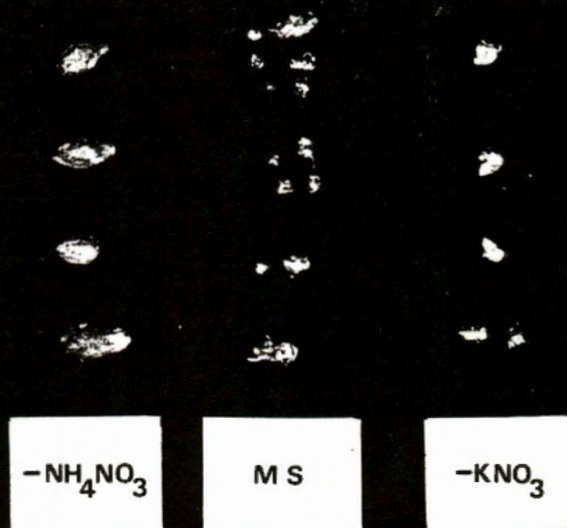


Figure 11. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des plantules de *D. alata* cv. 'Florida'.¹

A- Comparaison de l'aspect de plantules produites sur les trois milieux étudiés. (barre = 1 cm)

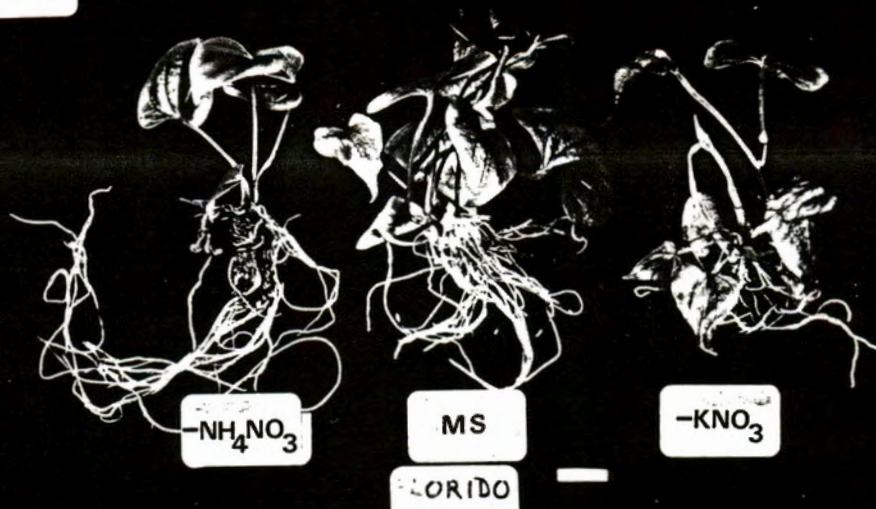
B- Comparaison de l'aspect des microtubercules produits par des plantules cultivées sur les trois milieux étudiés. (barre = 1 cm)

(Récoltes de microtubercules provenant de quatre plantules par milieu)

¹ Les symboles utilisés MS, -NH₄NO₃ et -KNO₃ représentent respectivement le témoin, le milieu sans NH₄NO₃ et le milieu sans KNO₃.

Le système racinaire, de même que les tiges si présentes sur les microtubercules de la figure B, ont été éliminés pour permettre une meilleure visualisation des diverses structures.

11 A



11 B

FLORIDO

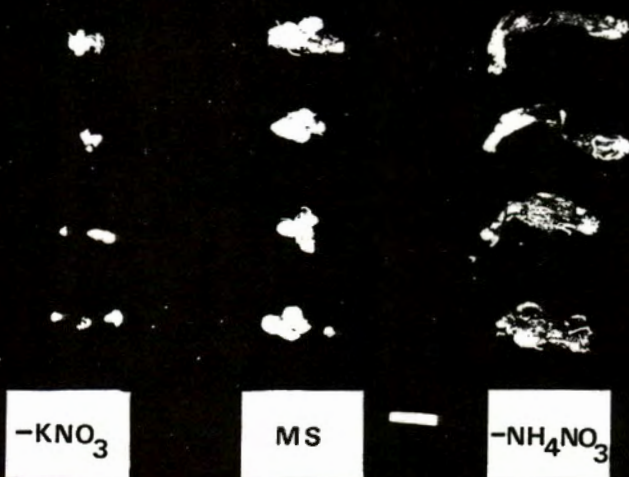
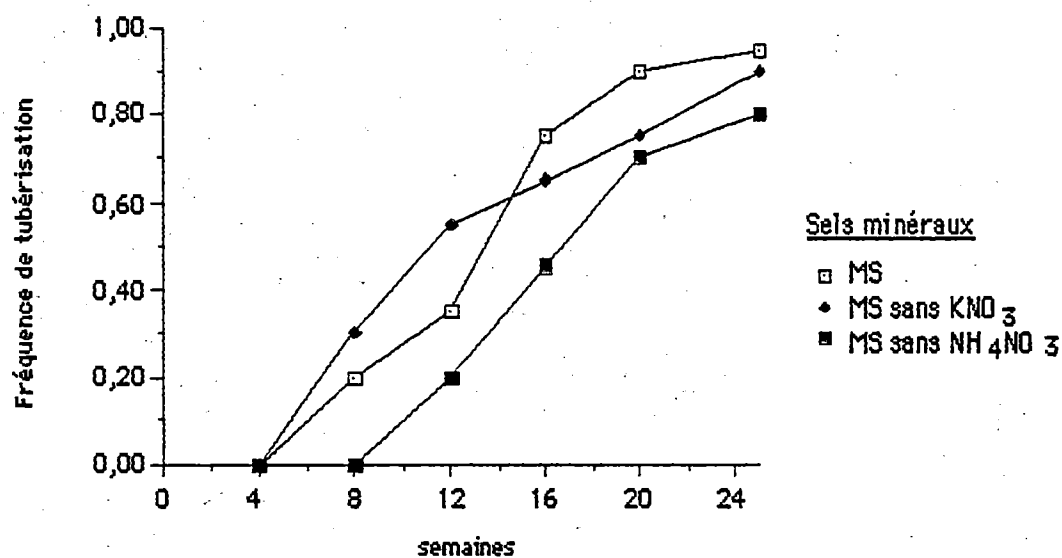


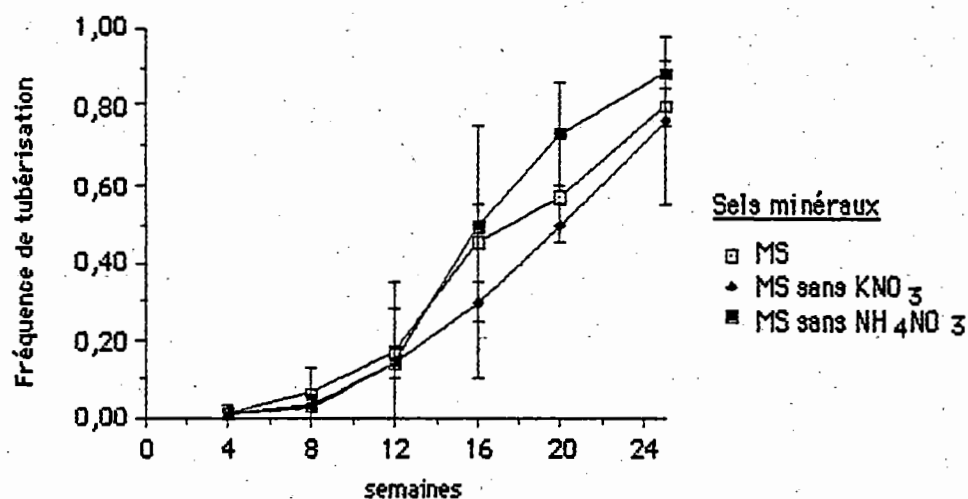
Figure 12. Influence de modifications de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution de la tubérisation chez *D. thyssinica*¹



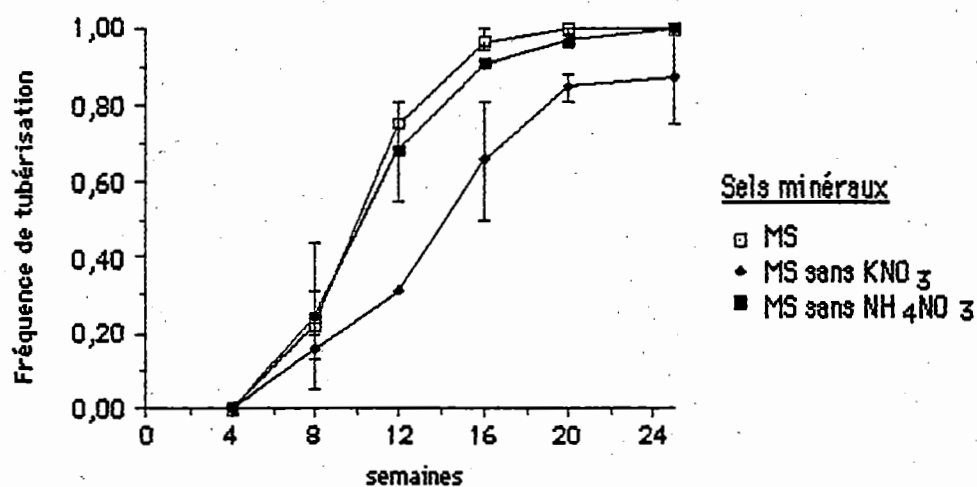
¹ L'erreur-type associée à chacune des valeurs n'a pas été déterminée, cette expérience n'ayant été effectuée qu'une seule fois.

Figure 13. Influence de modifications de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution de la tubérisation chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.¹

A- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

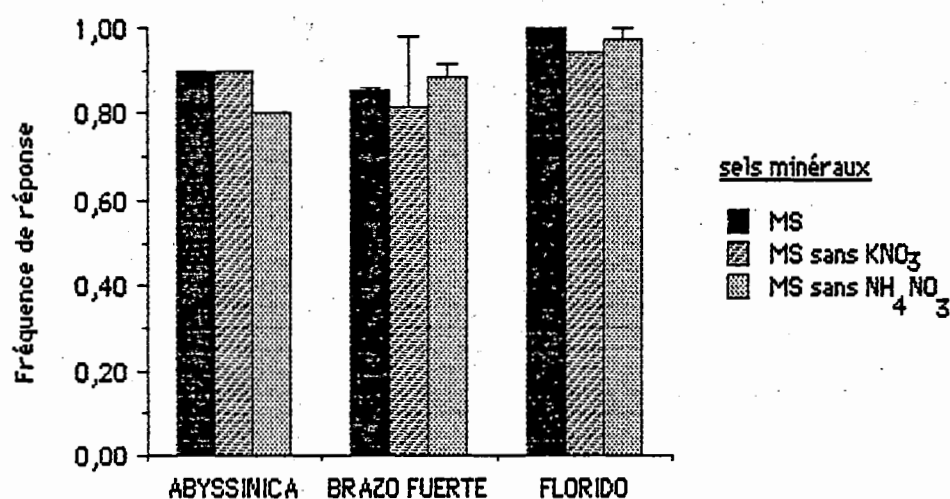


B- *D. alata* cv. 'Florida'



¹ Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

Figure 14. Influence de modifications de la composition minérale du milieu de culture sur la réponse des explantats de *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.¹



¹ Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. A l'exception de chez *D. abyssinica* où l'erreur-type n'a pas été déterminée, dans tous les autres cas l'absence de barre représente une valeur égale à zéro.

1.4.1.4- Survie et qualité de la réponse des explantats

Les deux modifications étudiées n'affectent pas de façon prononcée la réponse des explantats, qui reste dans tous les cas supérieure à 80 % (figure 14). Une légère diminution est toutefois remarquée chez *D. abyssinica* sur un milieu sans NH_4NO_3 , chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' sur celui sans KNO_3 et chez *D. alata* cv. 'Florida' sur les deux milieux modifiés. Cependant il est difficile d'évaluer la portée de ces observations, ce type d'expériences n'ayant été répété qu'une ou deux fois.

1.4.2- Caractéristiques particulières à une espèce

1.4.2.1- *D. abyssinica*

1.4.2.1.1- Développement de l'appareil caulinaire

Les plantules formées sur un milieu sans NH_4NO_3 ressemblent à celles du témoin (figure 10 A) mais paraissent souvent plus vigoureuses et en meilleure santé qu'elles, ne présentant jamais les signes d'étiollement (entrenoeuds très longs, tiges d'un vert pâle, légèrement plus épaisses et cassantes que la normale, feuilles parfois non cordées) quelquefois notés chez ces dernières. Par contre, la plupart des plantules cultivées sur un milieu sans KNO_3 montrent de tels symptômes.

1.4.2.1.2- Développement des microtubercules

La culture sur un milieu sans NH_4NO_3 paraît favoriser la formation de microtubercules de forme très allongée (figure 9 B). L'apparition des microtubercules semble toutefois un peu plus tardive sur ce milieu que sur le témoin (figure 12). Cependant, ce type d'expériences n'ayant été effectué qu'une seule fois chez cette espèce, il est difficile d'évaluer la portée de cette observation.

1.4.2.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'

1.4.2.2.1- Développement de l'appareil caulinaire

L'appareil caulinaire des deux cultivars se comporte de façon similaire face aux modifications étudiées (figures 10 A et 11 A). Les plantules obtenues sur un milieu sans NH_4NO_3 sont habituellement moins développées que celles produites sur le témoin, bien que la présence de très longs pétioles leur assure souvent une hauteur comparable. Elles possèdent en effet beaucoup moins de noeuds et ne se ramifient que rarement. Cependant, ces plantules paraissent aussi vigoureuses que celles du témoin, semblant seulement plus jeunes (chez 'Brazo fuerte', elles conservent longtemps une coloration pourpre, de type "juvénile"). Elles sont d'ailleurs souvent moins sénescentes que les autres au moment de l'arrêt de l'expérience.

La culture sur un milieu sans KNO_3 provoque une sénescence prématurée des plantules. Bien que paraissant au départ aussi vigoureuses que celles du témoin, elles montrent rapidement des signes de sénescence et sont presque complètement mortes à la fin de l'expérience. De plus, les portions les plus tardivement formées (nouvelles tiges ou ramifications) ont parfois une apparence anormale, étant plutôt épaisses, avec des entrenoeuds courts et des feuilles minuscules (figure 15 A).

1.4.2.2.2- Développement des microtubercules

Bien que l'aspect des microtubercules de 'Brazo fuerte' soit en général peu affecté par les modifications étudiées (figure 10 B), chez 'Florida' par contre, la culture sur un milieu sans NH_4NO_3 favorise la production de microtubercules de forme nettement plus allongée et ayant une écorce plus brunâtre que sur les autres milieux (figure 11 B). La formation de microtubercules anormaux (figure 15 B) est parfois observée chez les plantules cultivées sur le milieu sans KNO_3 . Ils ont alors un épiderme jaunâtre et l'écorce qui apparaît à leur surface n'est pas aussi bien structurée que celle des microtubercules habituels.

Dans les conditions de culture utilisées pour ce type d'expériences, la tubérisation paraît s'effectuer plus rapidement chez 'Florida'

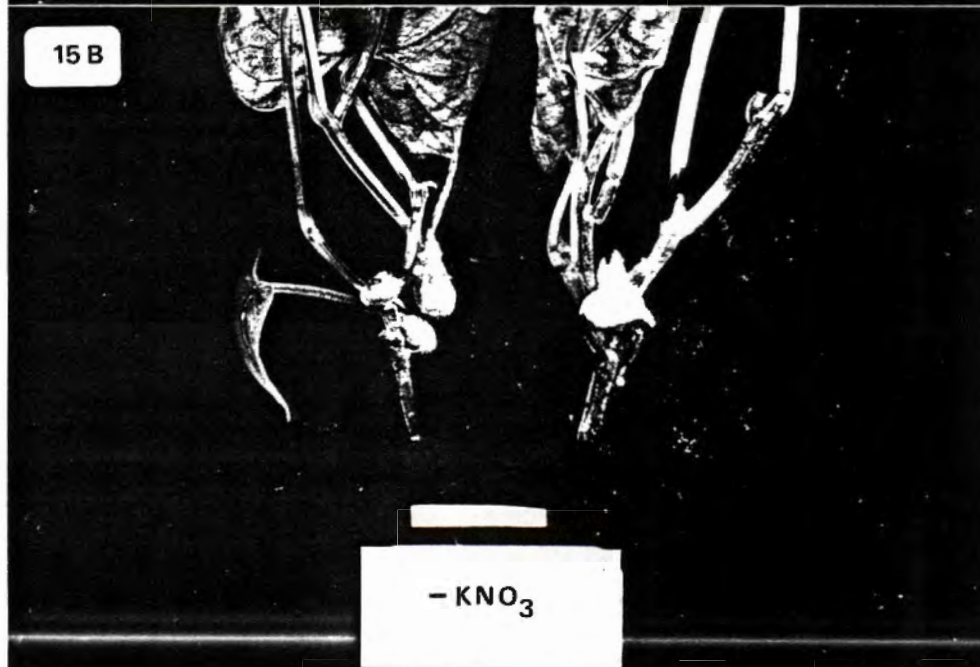
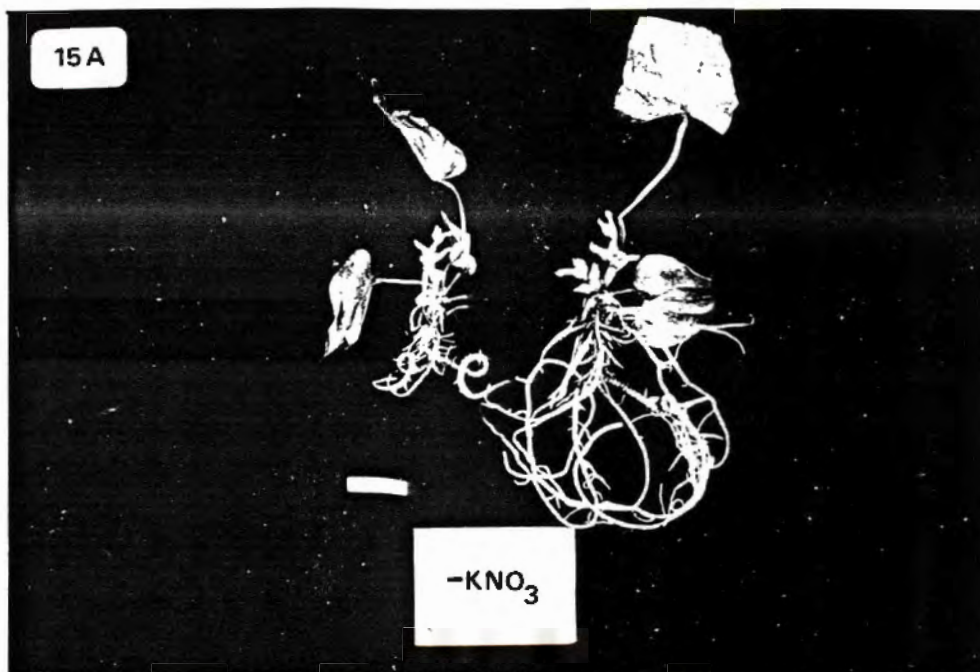
Figure 15. Malformations observées chez les plantules de *D. alata* cv. 'Florido' produites sur un milieu de culture ne contenant pas de KNO_3 .

A- Tiges et ramifications anormales. (barre = 1 cm)

B- Aspect des microtubercules. (barre = 1 cm)

A gauche, normaux.

A droite, anormaux.



que chez 'Brazo fuerte' (figure 13). En effet, seule 50% des explantats de ce dernier portent un microtubercule à la 16^e semaine de la culture alors que chez 'Florido', presque tous sont déjà tubérisés (la tubérisation paraît toutefois légèrement plus lente sur un milieu sans KNO_3).

2- Influence de divers paramètres sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'

2.1- Influence de la photopériode sur la tubérisation *in vitro*

2.1.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés

Une modification de la photopériode influence de façon très hautement significative le rendement en microtubercules, le nombre de microtubercules produits et leur poids moyen ($p=0,000$, tableau V). Bien que les conditions testées affectent de façon différente les trois génotypes étudiés, dans tous les cas la culture à l'obscurité exerce un effet fortement inhibiteur sur le rendement et le nombre de microtubercules produits (tableaux VI, VII et VIII).

Lorsque les microtubercules sont répartis en deux classes, la première regroupant ceux de poids peu élevé (inférieur à 0,100 g chez *D. abyssinica* ou à 0,050 g chez *D. alata*) et la seconde ceux de poids plus important, ceci permet de constater que le poids moyen n'est pas une variable très représentative. En effet même dans les conditions de culture où le poids moyen est maximal, plus de 50% des microtubercules se retrouvent dans la catégorie inférieure (tableaux IX, X et XI).

Tableau V. Résultats d'analyses de variance (ANOVA) effectuées pour détecter l'existence d'une influence de la photopériode, du type de contenant et de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.¹

	Rendement	Nombre de microtubercules	Poids moyen des microtubercules
<u><i>D. abyssinica</i></u>			
photopériode	***	***	***
contenant	N.S.	*	N.S.
sels minéraux	***	N.S.	***
<u><i>D. alata</i></u> <u>cv. 'Brazo fuerte'</u>			
photopériode	***	***	***
contenant	***	N.S.	***
sels minéraux	***	***	***
<u><i>D. alata</i></u> <u>cv. 'Florida'</u>			
photopériode	***	***	***
contenant	N.S.	*	N.S.
sels minéraux	***	*	***

¹ Symboles utilisés pour désigner chaque seuil de probabilité:

*** = $p < 0,001$

* = $p < 0,05 - 0,01$

** = $p < 0,01 - 0,001$

N.S. = $p > 0,05$ (non-significatif)

Tableau VI. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica*.¹

Photopériode	N ²	Rendement (en gramme)	Nombre de microtubercules	Poids moyen des microtubercules (en gramme)
<u>Culture en boîte</u>				
0 h	28	0,073 ^a	1,2 ^a	0,070 ^a
8 h	26	0,317 ^{bc}	1,7 ^{ab}	0,220 ^{bc}
16 h	22	0,214 ^{abc}	2,0 ^{ab}	0,115 ^{abc}
24 h	13	0,117 ^{ab}	2,5 ^{bc}	0,050 ^a
<u>Culture en tube</u>				
0 h	27	0,064 ^a	1,3 ^{ab}	0,061 ^a
8 h	28	0,345 ^c	1,9 ^{ab}	0,244 ^c
16 h	8	0,083 ^{ab}	2,0 ^{ab}	0,034 ^a
24 h	10	0,205 ^{abc}	3,9 ^c	0,069 ^{ab}

¹ Les valeurs d'une même colonne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de $p < 0,001$ selon un test de comparaison multiple LSD.

² N = Nombre d'explantats ayant répondu à la culture.

Tableau VII. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la tubérisation *in vitro* chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.¹

Photopériode	N ²	Rendement (en gramme)	Nombre de microtubercules	Poids moyen des microtubercules (en gramme)
<u>Culture en boîte</u>				
0 h	19	0,009 ^a	0,7 ^a	0,007 ^a
8 h	25	0,284 ^d	3,4 ^b	0,067 ^d
16 h	34	0,193 ^{bcd}	5,8 ^c	0,034 ^{bc}
24 h	30	0,247 ^{cd}	4,8 ^{bc}	0,053 ^{cd}
<u>Culture en tube</u>				
0 h	13	0,012 ^{ab}	1,0 ^a	0,007 ^a
8 h	25	0,115 ^{abc}	3,5 ^b	0,031 ^{bc}
16 h	26	0,081 ^{ab}	5,3 ^c	0,016 ^b
24 h	20	0,124 ^{abcd}	6,6 ^c	0,021 ^b

¹ Les valeurs d'une même colonne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de $p < 0,001$ selon un test de comparaison multiple LSD.

² N = Nombre d'explantats ayant répondu à la culture.

Tableau VIII. Influence de la photopériode et du type de contenant sur la tubérisation *in vitro* chez *D. alata* cv. 'Florida'.¹

Photopériode	N ²	Rendement (en gramme)	Nombre de microtubercules	Poids moyen des microtubercules (en gramme)
<u>Culture en boîte</u>				
0 h	12	0,036 ^a	1,0 ^a	0,036 ^a
8 h	32	0,219 ^{bc}	2,7 ^a	0,103 ^b
16 h	34	0,287 ^{cd}	7,9 ^b	0,035 ^a
24 h	32	0,360 ^d	7,7 ^b	0,047 ^a
<u>Culture en tube</u>				
0 h	9	0,019 ^a	1,1 ^a	0,017 ^a
8 h	27	0,211 ^{abc}	2,9 ^a	0,097 ^b
16 h	30	0,143 ^{ab}	8,5 ^b	0,018 ^a
24 h	30	0,253 ^{bcd}	8,2 ^b	0,034 ^a

¹ Les valeurs d'une même colonne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de $p < 0,001$ selon un test de comparaison multiple LSD.

² N = Nombre d'explantats ayant répondu à la culture.

Tableau IX. Influence de la photopériode sur la distribution des microtubercules de *D. abyssinica*.

photopériode	N ¹	Poids des microtubercules			
		< 0,100 g		>= 0,100 g	
0 h	69	80%	(55/69)	20%	(14/69)
8 h	96	56%	(54/96)	44%	(42/96)
16 h	61	72%	(44/61)	17%	(17/61)
24 h	76	86%	(61/76)	10%	(10/71)

¹ N = Nombre total de microtubercules récoltés pour ce type d'expériences.

Tableau X. Influence de la photopériode sur la distribution des microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.

photopériode	N ¹	Poids des microtubercules	
		< 0,050 g	>= 0,050 g
0 h	26	96% (25/26)	4% (1/26)
8 h	172	76% (130/172)	24% (42/172)
16 h	337	88% (295/337)	12% (42/337)
24 h	278	79% (221/278)	21% (57/278)

¹ N = Nombre total de microtubercules récoltés pour ce type d'expériences.

Tableau XI. Influence de la photopériode sur la distribution des microtubercules de *D. alata* cv. 'Florida'.

photopériode	N ¹	Poids des microtubercules	
		< 0,050 g	>= 0,050 g
0 h	22	86% (19/22)	14% (3/22)
8 h	170	57% (97/170)	43% (73/170)
16 h	529	88% (467/529)	12% (62/529)
24 h	506	78% (394/506)	22% (112/506)

¹ N = Nombre total de microtubercules récoltés pour ce type d'expériences.

2.1.2- Caractéristiques particulières à une espèce

2.1.2.1- *D. abyssinica*

2.1.2.1.1- Rendement en microtubercules

Une photopériode de 8 h assure un rendement maximum, permettant de produire en moyenne 0,330 gramme de microtubercules par explantat (tableau VI). Les photopériodes de 16 h et 24 h donnent quant-à-elles des résultats supérieurs à ceux obtenus à l'obscurité et ce, malgré le fait qu'elles nuisent fortement à la survie et à la qualité de la réponse des explantats mis en culture (section 1.2.2.1.4).

2.1.2.1.2- Nombre de microtubercules produits

Une photopériode de 24 h (éclairage constant) permet d'obtenir en moyenne trois microtubercules par plantule (tableau VI). Les plantules cultivées aux photopériodes de 8 h et 16 h n'en produisent habituellement que deux alors que celles conservées à l'obscurité n'en forment qu'un seul.

2.1.2.1.3- Poids moyen des microtubercules

Une photopériode de 8 h permet de produire les microtubercules de poids moyen le plus élevé (soit 0,220 g en boîte et 0,244 g en tube, tableau VI). Toutefois, même à cette photopériode, 56% des microtubercules sont de taille inférieure à 0,100 g (tableau IX). La proportion de petits microtubercules notée aux autres photopériodes est cependant beaucoup plus élevée.

2.1.2.2- *D. alata* cv. 'Braza fuerte' et 'Florida'

2.1.2.2.1- Rendement en microtubercules

Chez les deux cultivars de *D. alata*, les photopériodes de 8 h, 16 h et 24 h permettent d'obtenir des rendements plus ou moins similaires (tableaux VII et VIII). Cependant, le rendement de 'Braza fuerte' en photopériode de 16 h est légèrement inférieur à celui déterminé dans les

deux cas, et chez 'Florido' une photopériode de 24 h (éclairage constant) favorise une légère augmentation de rendement.

2.1.2.2.2- Nombre de microtubercules produits

La production d'un nombre élevé de microtubercules est favorisée par les photopériodes de 16 h et de 24 h. En effet, elles permettent d'obtenir entre cinq à sept microtubercules par plantule chez 'Brazo fuerte' (tableau VII) et approximativement huit chez 'Florido' (tableau VIII). Par comparaison, une photopériode de 8 h ne permet d'en obtenir qu'environ trois.

2.1.2.2.3- Poids moyen des microtubercules

L'influence de la photopériode sur le poids moyen des microtubercules diffère d'un cultivar à l'autre, le comportement de 'Florido' se rapprochant plutôt de celui de *D. abyssinica*. En effet chez ce cultivar, une photopériode de 8 h permet de produire des microtubercules pesant plus du double de ceux obtenus aux autres photopériodes (tableau VIII) et la proportion de microtubercules dépassant 0,050 g atteint 43% (tableau XI), ce qui est de beaucoup supérieur à celle des autres conditions étudiées.

Chez 'Brazo fuerte' par contre les photopériodes de 8 h, 16 h et 24 h permettent la production de microtubercules de poids assez similaire (tableau VII). Une photopériode de 16 h paraît toutefois donner un résultat légèrement inférieur à celui obtenu dans les deux autres cas et une observation de la répartition des microtubercules permet de constater que la proportion de gros microtubercules y est aussi nettement inférieure (tableau X).

2.2- Influence du contenant de culture sur la tubérisation *in vitro*

L'influence du type de contenant sur la tubérisation *in vitro* paraît varier selon le génotype et le paramètre considérés. Cependant, la réponse du cultivar 'Florido' se rapproche de celle de *D. abyssinica* plutôt que de celle de 'Brazo fuerte', l'autre cultivar de *D. alata*.

2.2.1- *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Florida'

Chez ces deux plantes, le type de contenant n'exerce aucune influence sur le rendement et n'affecte pas le poids moyen des microtubercules. Cependant, il agit de façon significative sur le nombre de microtubercules produits, mais seulement à un seuil de probabilité de 0,050 ($p=0,018$ chez *D. abyssinica* et $p=0,035$ chez 'Florida', tableau V). Son influence sur la tubérisation paraît donc moins importante que celle de la photopériode.

Une comparaison des résultats obtenus pour les deux types de contenant permet de constater que le nombre de microtubercules produits en tube est toujours supérieur ou égal à celui obtenu en boîte (tableaux VI et VIII). La différence n'est cependant pas très grande, étant habituellement inférieure à un.

2.2.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

Le contenant n'exerce aucune influence significative sur le nombre de microtubercules produits. Par contre il affecte de façon très hautement significative le rendement et le poids moyen des microtubercules ($p=0,000$, tableau V). Dans les deux cas, les résultats obtenus en boîte sont supérieurs ou égaux à ceux mesurés en tube (tableau VII).

2.3- Interaction entre la photopériode et le contenant de culture sur la tubérisation *in vitro*

Chez *D. abyssinica*, les analyses effectuées n'ont permis de déceler aucune interaction significative entre la photopériode et le contenant et ce, pour les trois variables testées (rendement, nombre de microtubercules et leur poids moyen). Par contre, de faibles interactions sont parfois notées chez les cultivars de *D. alata*. Cependant, cette analyse n'étant basée que sur un faible nombre de réplicats et comme les probabilités déterminées ne sont significatives qu'à un seuil de $p < 0,05-0,001$, des études plus poussées devront être effectuées pour confirmer l'existence de telles interactions.

2.4- Influence de la composition minérale du milieu nutritif sur la tubérisation *in vitro*

2.4.1- Caractéristiques communes aux trois génotypes étudiés

Bien que les deux modifications étudiées influencent le rendement et le poids moyen des microtubercules de façon différente selon le génotype considéré, dans tous les cas leur effet est très hautement significatif ($p=0,000$, tableau V).

Ces modifications n'ont cependant aucune influence significative sur le nombre de microtubercules obtenus chez *D. abyssinica* (tableau V) où un seul microtubercule est produit par explantat, sur le témoin comme sur les milieux modifiés (tableau XII). Par contre, elles affectent significativement les résultats obtenus chez *D. alata*, de façon cependant moins prononcée chez 'Florida' ($p=0,018$) que chez 'Brazo fuerte' ($p=0,000$) (tableau V).

2.4.2- Caractéristiques particulières à une espèce

2.4.2.1- *D. abyssinica*

2.4.2.1.1- Rendement en microtubercules

Alors que l'absence de NH_4NO_3 n'affecte pas le rendement en microtubercules, celle de KNO_3 le diminue de façon importante. En effet, le rendement obtenu sur un tel milieu est de beaucoup inférieur à celui du témoin (respectivement de 0,100 g et 0,310 g, tableau XII).

2.4.2.1.2- Poids moyen des microtubercules

Alors que l'absence de NH_4NO_3 n'affecte pas le poids moyen des microtubercules, celle de KNO_3 le diminue de façon importante. En effet, le poids moyen des microtubercules produits sur ce milieu est près de trois fois moins élevé que celui du témoin (respectivement de 0,093 g et 0,252 g, tableau XII) et la proportion de microtubercules de poids

Tableau XII. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation *in vitro* chez *D. abyssinica*.¹

Sels minéraux	N ²	Rendement (en gramme)	Nombre de microtubercules	Poids moyen des microtubercules (en gramme)
MS	18	0,310 ^b	1,4 ^a	0,252 ^{ab}
MS sans KNO ₃	18	0,098 ^a	1,2 ^a	0,093 ^a
MS sans NH ₄ NO ₃	16	0,296 ^b	1,2 ^a	0,270 ^b

¹ Les valeurs d'une même colonne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de $p < 0,001$ selon un test de comparaison multiple LSD.

² N = Nombre d'explantats ayant répondu à la culture.

Tableau XIII. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la distribution de microtubercules de *D. abyssinica*.

sels minéraux	N ¹	Poids des microtubercules	
		< 0,100 g	>= 0,100 g
MS	26	38% (10/26)	62% (16/26)
MS sans KNO ₃	21	71% (15/21)	29% (6/21)
MS sans NH ₄ NO ₃	19	32% (6/19)	68% (13/19)

¹ N = Nombre total de microtubercules récoltés pour ce type d'expériences.

supérieur à 0,100 g y est de beaucoup inférieure à celle du témoin (29% versus 62%, tableau XIII).

2.4.2.2- *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'

2.4.2.2.1- Rendement en microtubercules

Chez ces deux cultivars, l'absence de NH_4NO_3 augmente de façon importante le rendement en microtubercules, qui est approximativement du triple de celui du témoin (respectivement 0,149 g et 0,050 g chez 'Brazo fuerte', tableau XIV ; 0,439 g et 0,164 g chez 'Florida', tableau XV). Cependant alors que l'absence de KNO_3 n'affecte pas le rendement du cultivar 'Brazo fuerte' (tableau XIV), elle diminue fortement celui des explantats de 'Florida' (tableau XV).

2.4.2.2.2- Nombre de microtubercules produits

Le nombre de microtubercules produits sur les deux milieux modifiés (sans KNO_3 et sans NH_4NO_3) est inférieur à celui obtenu sur le témoin (tableaux XIV et XV). Cette diminution est cependant assez faible, étant habituellement inférieure à un.

2.4.2.2.3- Poids moyen des microtubercules

L'absence de NH_4NO_3 augmente de façon importante le poids moyen des microtubercules. Elle le multiplie par six chez 'Brazo fuerte' (tableau XIV) et par trois chez 'Florida' (tableau XV). De plus, lorsqu'ils sont repartis en deux classes (la première regroupant ceux de moins de 0,050 g et l'autre ceux de poids supérieur ou égal à ce seuil), respectivement 75% et 85% des microtubercules obtenus avec cette condition de culture sont de la catégorie supérieure (tableaux XVI et XVII).

Enfin chez 'Florida', l'absence de KNO_3 paraît diminuer le poids moyen des microtubercules produits (bien que de façon non significative). Il est en effet de beaucoup inférieur à celui obtenu pour le témoin (respectivement de 0,021 g et 0,112 g, tableau XV). D'ailleurs, les microtubercules de poids supérieur à 0,050 g ne représentent que 2% de tous ceux produits sur ce milieu.

Tableau XIV. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation *in vitro* chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.¹

Sels minéraux	N ²	Rendement (en gramme)	Nombre de microtubercules	Poids moyen des microtubercules (en gramme)
MS	52	0,050 ^a	2,4 ^b	0,021 ^a
MS sans KNO ₃	52	0,036 ^a	1,4 ^a	0,026 ^a
MS sans NH ₄ NO ₃	50	0,149 ^b	1,1 ^a	0,129 ^b

¹ Les valeurs d'une même colonne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de $p < 0,001$ selon un test de comparaison multiple LSD.

² N = Nombre d'explantats ayant répondu à la culture.

Tableau XV. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la tubérisation *in vitro* chez *D. alata* cv. 'Florida'.¹

Sels minéraux	N ²	Rendement (en gramme)	Nombre de microtubercules*	Poids moyen des microtubercules (en gramme)
MS	32	0,164 ^{ab}	1,9 ^b	0,112 ^a
MS sans KNO ₃	30	0,030 ^a	1,5 ^{ab}	0,021 ^a
MS sans NH ₄ NO ₃	31	0,439 ^b	1,3 ^a	0,392 ^b

¹ Les valeurs d'une même colonne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de $p < 0,001$ (" * " : $p < 0,05-0,01$) selon un test de comparaison multiple LSD.

² N = Nombre d'explantats ayant répondu à la culture.

Tableau XVI. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la distribution de microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.

sels minéraux	N ¹	Poids des microtubercules	
		< 0,050 g	>= 0,050 g
MS	126	87% (110/126)	13% (16/126)
MS sans KNO ₃	73	89% (65/73)	11% (8/73)
MS sans NH ₄ NO ₃	59	25% (15/59)	75% (44/59)

¹ N = Nombre total de microtubercules récoltés pour ce type d'expériences.

Tableau XVII. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la distribution de microtubercules de *D. alata* cv. 'Florida'.

sels minéraux	N ¹	Poids des microtubercules	
		< 0,050 g	>= 0,050 g
MS	61	36% (22/61)	64% (39/61)
MS sans KNO ₃	45	98% (44/45)	2% (1/45)
MS sans NH ₄ NO ₃	40	15% (6/40)	85% (34/40)

¹ N = Nombre total de microtubercules récoltés pour ce type d'expériences.

3- Essais de germination *in vitro* de microtubercules de *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazofuerte' et 'Florida'

3.1- Généralités

Les diverses expériences sur la tubérisation *in vitro* ont permis de constater que les conditions de culture qui accroissent le nombre de microtubercules produits sont habituellement différentes de celles augmentant leur poids moyen. Le chercheur est donc confronté au choix suivant: produire de nombreux petits microtubercules ou quelques-uns de poids plus important, accompagnés d'ailleurs d'une quantité souvent importante de microtubercules de petite taille.

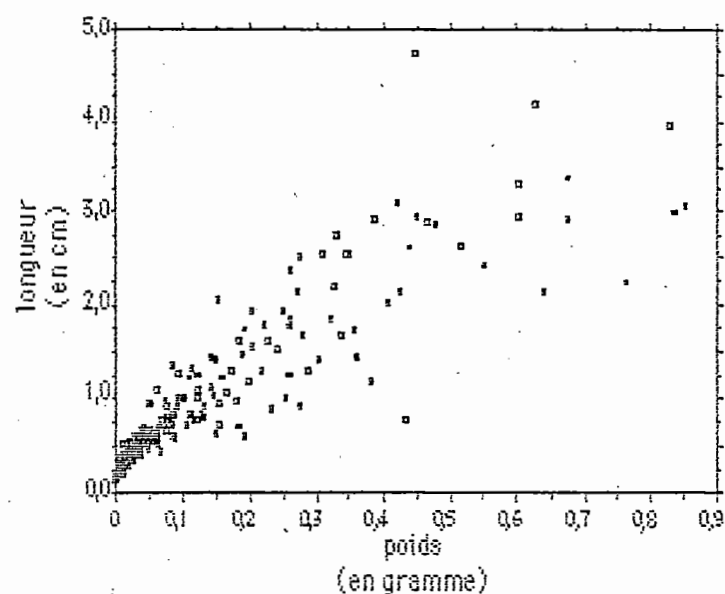
Comme ces microtubercules seront éventuellement utilisés pour la micropropagation des génotypes étudiés, le premier objectif des essais de germination *in vitro* est donc de déterminer si le pouvoir de germination des petits microtubercules est comparable à celui des grands. Pour ce faire, les microtubercules mis à germer ont été groupés en plusieurs catégories selon leur taille.

Au cours des expériences sur la tubérisation, le critère utilisé pour évaluer la taille des microtubercules était le poids. Cependant, son emploi devient fastidieux lorsque de grandes quantités de matériel doivent être manipulées rapidement et stérilement, comme c'est le cas pour des essais de germination *in vitro*. C'est pourquoi les catégories utilisées pour ces essais sont définies à l'aide de la longueur.

En effet, les microtubercules obtenus lors des expériences sur l'influence de la photopériode sur la tubérisation ont été à la fois pesés et mesurés (longueur et largeur). Les diagrammes de dispersion établis à partir de ces données ont permis de constater qu'il existe une forte relation entre le poids d'un microtubercule et sa longueur, la relation étant toutefois plus étroite lorsque la taille est évaluée en tenant compte simultanément de la longueur et de la largeur (figures 16, 17 et 18), particulièrement pour les microtubercules de taille élevée.

Figure 16. Relation entre le poids et la taille des microtubercules chez *D. abyssinica*.

A- taille décrite par la longueur.



B- taille décrite par la longueur multipliée par la largeur.

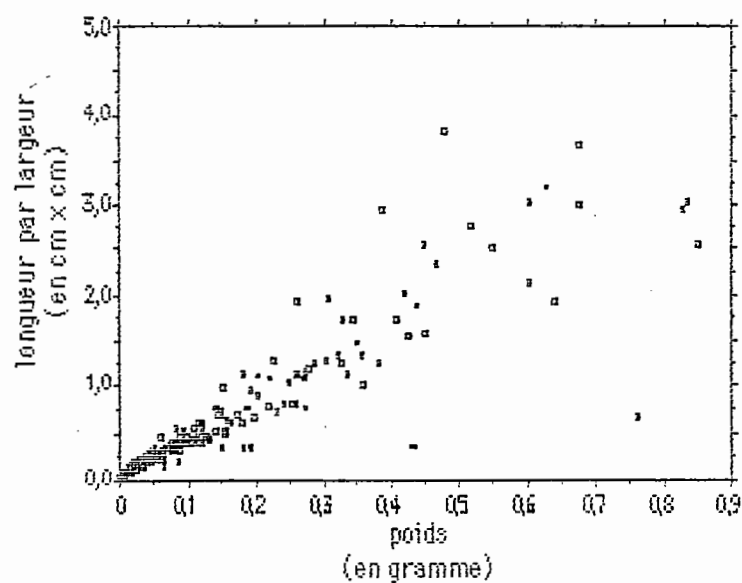
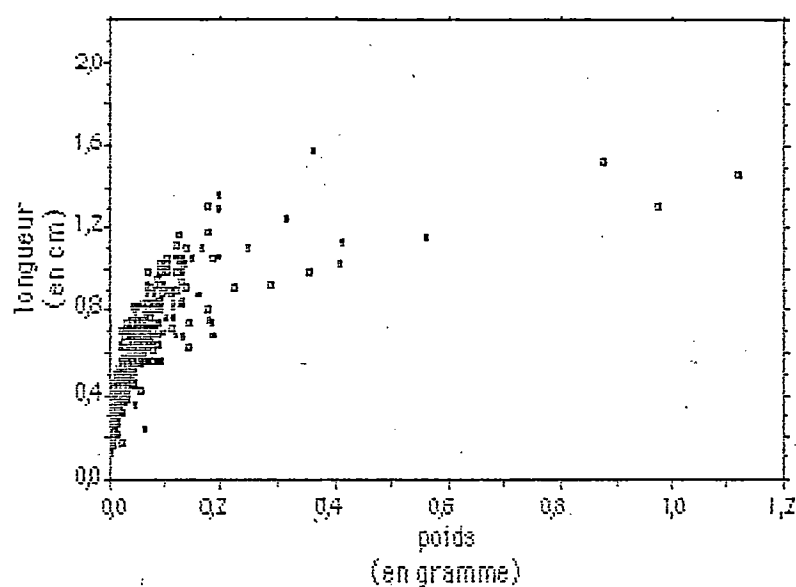


Figure 17. Relation entre le poids et la taille des microtubercules chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.

A- taille décrite par la longueur.



B- taille décrite par la longueur multipliée par la largeur.

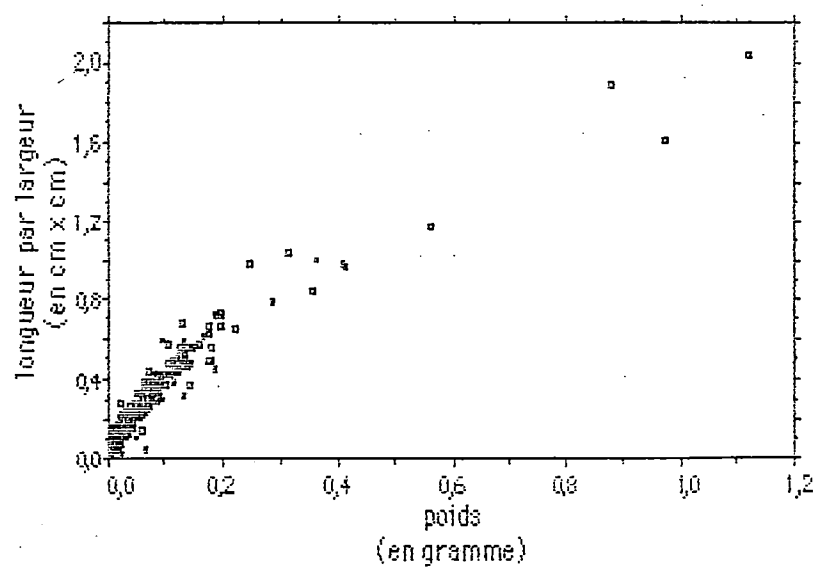
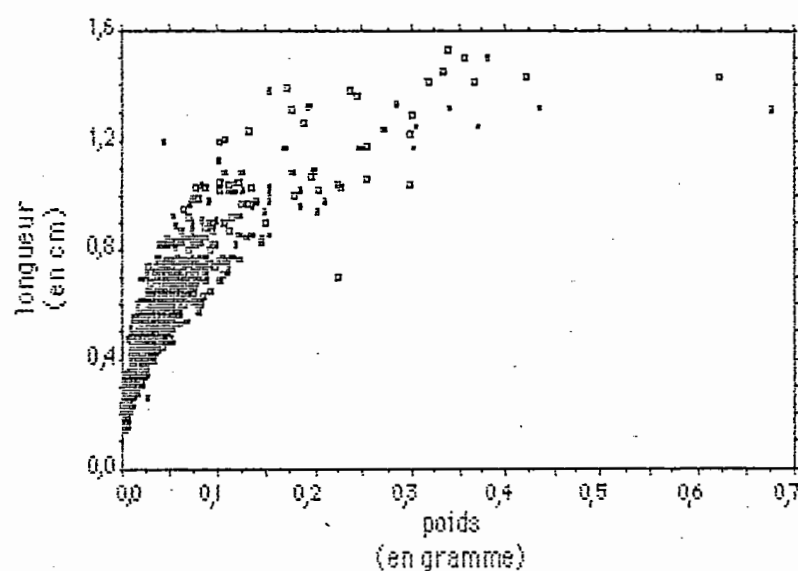
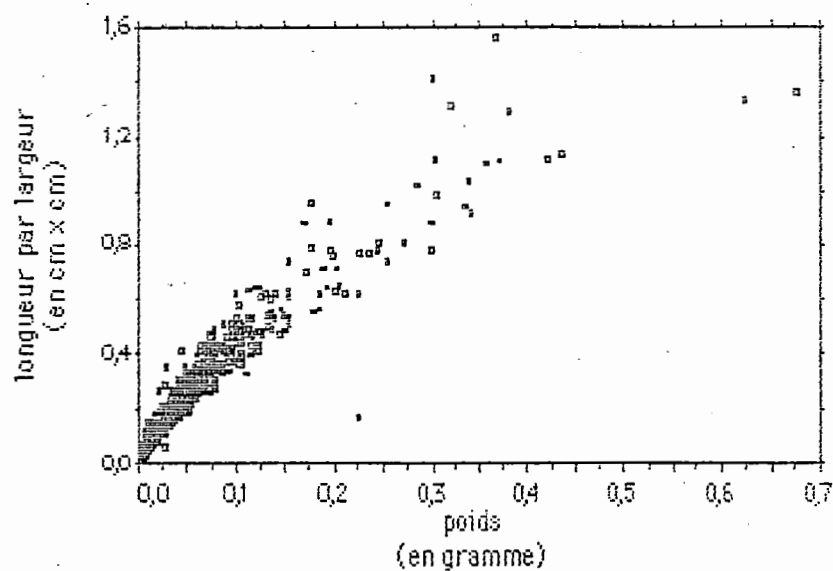


Figure 18. Relation entre le poids et la taille des microtubercules chez *D. alata* cv. 'Florida'.

A- taille décrite par la longueur.



B- taille décrite par la longueur multipliée par la largeur.



Cependant, comme la majorité des microtubercules mis en culture sont de grandeur inférieure à 0,8 cm / 0,100 g, la longueur peut être considérée une mesure représentative de la taille. De plus, son emploi nécessite peu de manipulations et moins de calculs que celui d'une valeur tenant compte à la fois de la longueur et de la largeur. C'est pourquoi elle a été retenue comme critère pour établir les catégories de microtubercules utilisées pour les essais de germination *in vitro*

3.2- Essais de germination *in vitro* de microtubercules entiers

3.2.1- Evolution des microtubercules mis en culture

A l'exception des microtubercules du cultivar 'Florida' semés après cinq semaines de conservation qui sont restés complètement quiescents, la plupart des autres microtubercules mis en culture ont formé une tige et des racines. Cependant, un certain nombre d'entre eux n'ont produit que des racines sans former de tiges. Ce travail étant axé sur la micropropagation, seuls les microtubercules ayant produit des tiges ont été considérés comme ayant répondu de façon satisfaisante.

Lorsqu'un microtubercule est de taille suffisante pour permettre de distinguer une portion proximale (près du point d'abscission), médiane et distale, on constate que c'est dans la région proximale que se développent les tiges ainsi que la plupart des racines. La formation de racines est quelquefois observée dans la partie distale, mais la région médiane ne produit généralement rien.

Les plantules provenant de la germination *in vitro* de microtubercules ressemblent à celles formées par les cultures de segments uninodaux (figure 19) et se développent de façon similaire. Après 13 semaines de culture, elles ont parfois produit un jeune microtubercule à leur base.

La formation d'un cal (beige, friable et assez abondant) est observée sur la plupart des microtubercules mis en culture, sauf chez

Figure 19. Influence de la taille des microtubercules de *D. abyssinica* et de *D. alata* cv. 'Florida' sur le développement des plantules qu'ils produisent.

A- Comparaison de plantules de *D. abyssinica* produites par des microtubercules de taille différente. (barre = 1 cm).

Haut, plantules provenant de microtubercules mis en culture 10 semaines après leur récolte.

Bas, plantules provenant de microtubercules mis en culture immédiatement après leur récolte.

Les catégories représentent des plantules produites par des microtubercules de taille:

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1- inférieure à 2 mm | 4- comprise entre 6 et 8 mm |
| 2- comprise entre 2 et 4 mm | 5- comprise entre 8 et 10 mm |
| 3- comprise entre 4 et 6 mm | 6- supérieure à 10 mm |

B- Comparaison de plantules de *D. alata* cv. 'Florida' produites par des microtubercules de taille différente. (barre = 1 cm)

Les catégories représentent des plantules produites par des microtubercules de taille:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1- inférieure à 2 mm | 3- comprise entre 4 et 6 mm |
| 2- comprise entre 2 et 4 mm | 4- supérieure à 6 mm |

19A

CONSERVÉ

FRAIS

1

2

3

4

5

6

19B

1

2

3

4

'Florida', où il est présent surtout chez les microtubercules n'ayant pas germé. Cependant, chez ce génotype, les microtubercules mis en culture après un délai de conservation de cinq semaines n'en ont pas produit. De même chez *D. abyssinica*, bien que du cal soit formé sur la plupart de microtubercules semés aussitôt après leur récolte, son apparition est très rare chez ceux mis en culture après un délai de conservation de dix semaines.

3.2.2- Fréquence de germination des microtubercules

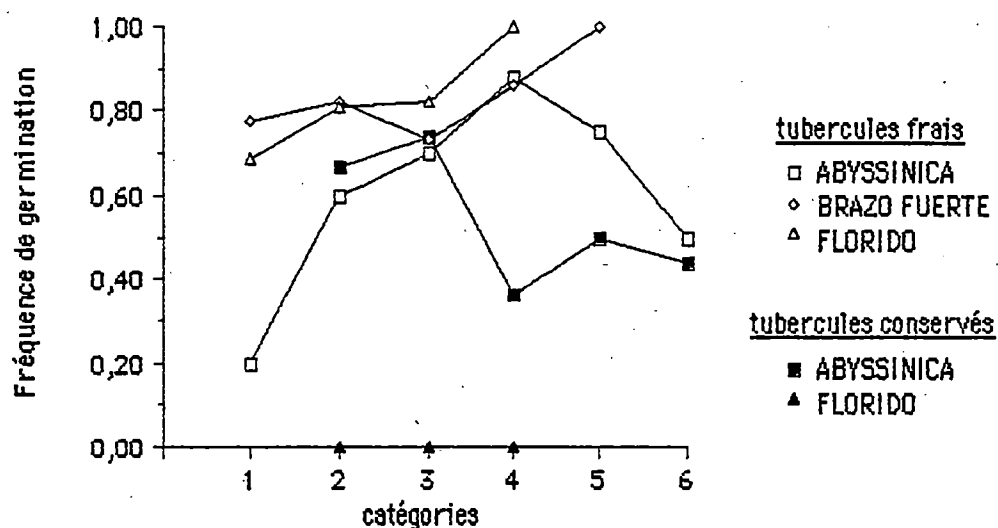
Le pouvoir de germination des microtubercules de *D. abyssinica* varie avec leur taille (figure 20). D'abord faible chez les plus petits microtubercules, la fréquence de germination atteint un maximum chez ceux de taille comprise entre 6 et 8 mm et diminue par la suite chez ceux de taille plus élevée. Une telle diminution est aussi observée chez les microtubercules ayant été conservés dix semaines avant d'être mis en culture. Le pouvoir de germination maximum y est toutefois observé chez les microtubercules de 4 à 6 mm de longueur et paraît légèrement moins élevé que celui noté chez ceux semés immédiatement après leur récolte (respectivement 74 % et 88 %). Cependant, il est difficile d'évaluer la portée de cette observation, ce type d'essais n'ayant été effectué qu'une seule fois.

Le pouvoir de germination des microtubercules des deux cultivars de *D. alata* est assez constant chez les microtubercules semés dès leur récolte, variant entre 73 % et 86 % chez 'Brazo fuerte' et 69 % et 82 % chez 'Florida' selon la taille (figure 20). Il semble toutefois augmenter chez les microtubercules de taille la plus élevée, atteignant alors 100 %. Cependant, les effectifs représentant ces catégories sont assez faibles. Des expériences plus poussées seront donc nécessaires pour confirmer l'existence de cette tendance.

3.2.3- Nombre de tiges produites par microtubercule

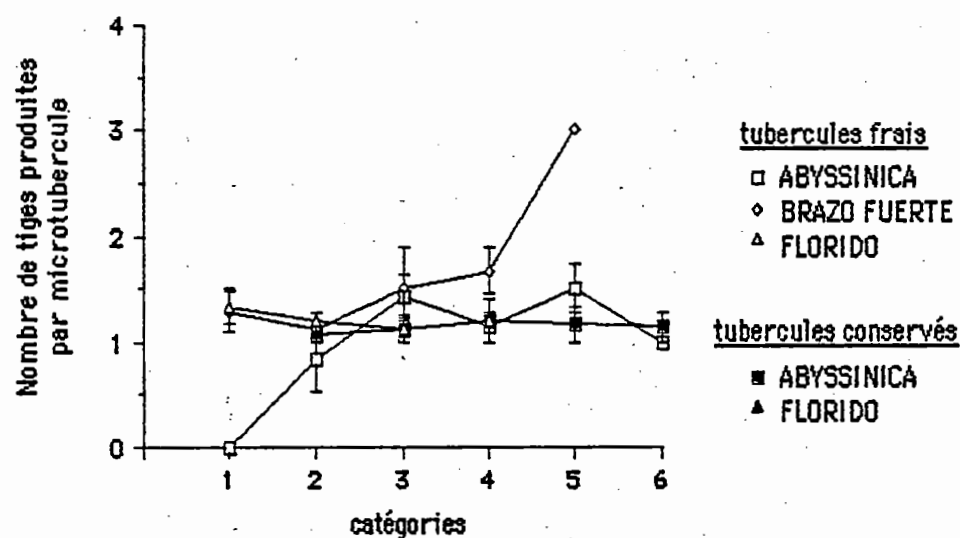
Chez *D. abyssinica*, les microtubercules de moins de 2 mm ne produisent que des tiges anormales (gonflées, paraissant friables). Chez 'Brazo fuerte' aussi, la formation de structures anormales (production

Figure 20. Influence de la taille sur la fréquence de germination des microtubercules de *D. abyssinica* et *D. aiata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'.



¹ Les catégories représentent, en sens ascendant, des microtubercules de taille croissante. Pour les limites exactes de chacune, voir le tableau III.

Figure 21. Influence de la taille sur le nombre de tiges produites par les microtubercules de *D. abyssinica* et *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido'.¹



¹ Les catégories représentent, en sens ascendant, des microtubercules de taille croissante. Pour les limites exactes de chacune, voir le tableau III. Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

d'une feuille non cordée sans formation de tiges) est parfois observée chez les microtubercules de petite taille. Ce travail étant axé sur la micropropagation, seules les structures normales ont été incluses dans le nombre de tiges produites par microtubercule.

Les microtubercules de toutes les catégories étudiées ne produisent habituellement qu'une seule tige (figure 21) et chez *D. abyssinica* la conservation n'affecte pas ce résultat. Cependant chez 'Brazo fuerte', un accroissement de la taille du microtubercule semble favoriser une augmentation du nombre de tiges produites. Cependant, les effectifs représentant ces catégories sont assez faibles. Des expériences plus poussées seront donc nécessaires pour confirmer l'existence de cette tendance.

3.3- Essais de germination des fragments de microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'

3.3.1- Généralités

Cette expérience a pour but de déterminer s'il est possible d'accroître le nombre total de tiges produites par un microtubercule en le découpant en plusieurs fragments et en cultivant chacun d'entre eux comme un microtubercule entier. Les résultats obtenus au cours des présents essais sont comparés à ceux recueillis pour des microtubercules entiers du même cultivar (sections 3.2.2 et 3.2.3) afin de déterminer l'impact de la fragmentation.

3.3.2- Evolution des fragments de microtubercules

Le plus souvent, un seul des fragments du microtubercule germe et forme une plantule, les autres restant quiescents ou ne produisant que quelques racines. La méthode de dissection utilisée ne permet toutefois pas de déterminer si ce phénomène est causé par une différence physiologique liée à la position réciproque des fragments sur le microtubercule. La formation de cal beige et friable est notée sur la plupart des fragments,

aussi bien chez ceux portant des tiges que chez les autres. Un éclatement du cortex et de l'écorce est quelquefois remarqué.

Les plantules formées par les fragments ressemblent à celles produites par des microtubercules entiers (figure 22) et se développent de façon similaire. Après 13 semaines de culture, elles ne portent cependant que rarement des microtubercules.

3.3.3- Fréquence de germination des microtubercules

La fréquence de germination est peu affectée par les coupures transversales (figure 23). En effet, le pouvoir de germination des microtubercules coupés en deux ou en tranches d'environ 2 mm d'épaisseur varie entre 63 % et 75 %, ce qui est comparable à celui de microtubercules entiers. Une certaine diminution est toutefois observée chez les fragments de microtubercules de catégorie de taille supérieure à 8 mm, où il n'est que de 50 %. Cependant, cette catégorie n'est représentée que par un seul individu ce qui rend difficile à évaluer la portée de ce résultat.

Le fait d'effectuer des coupures dans les deux sens (longitudinal et transversal) diminue par contre beaucoup le pouvoir de germination des microtubercules (figure 23). En effet, il n'est que de 49 % chez les microtubercules de 4 à 6 mm (qui ont été découpés en quatre) et tombe à 17 % chez ceux de 6 à 8 mm (qui ont été fragmentés en six).

3.3.4- Nombre de tiges produites par microtubercule

Une comparaison du nombre total de tiges formées par des microtubercules fragmentés à celui obtenu pour des microtubercules entiers paraît montrer que cette méthode ne permet pas d'accroître le nombre de tiges produites (figure 24). En effet, quelle que soit la taille du microtubercule découpé et la quantité de fragments qui a été formée, le nombre total de tiges produites par microtubercule fragmenté reste similaire à celui obtenu pour des microtubercules entiers.

Figure 22. Influence de la taille des microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' sur le développement des plantules produites par leurs fragments. (barres = 1 cm)

Les catégories représentent des plantules produites par des fragments d'un microtubercule de taille:

- 1 - inférieure à 2 mm, découpé de façon transversale.
- 2 - comprise entre 2 et 4 mm, découpé de façon transversale.
- 3a- comprise entre 4 et 6 mm, découpé de façon transversale.
- 3b- comprise entre 4 et 6 mm, découpé de façon transversale et longitudinale.
- 4a- comprise entre 6 et 8 mm, découpé de façon transversale.
- 4b- comprise entre 6 et 8 mm, découpé de façon transversale et longitudinale.
- 5 - supérieure à 10 mm, découpé de façon transversale.

22



1



2



3a



3b



4a

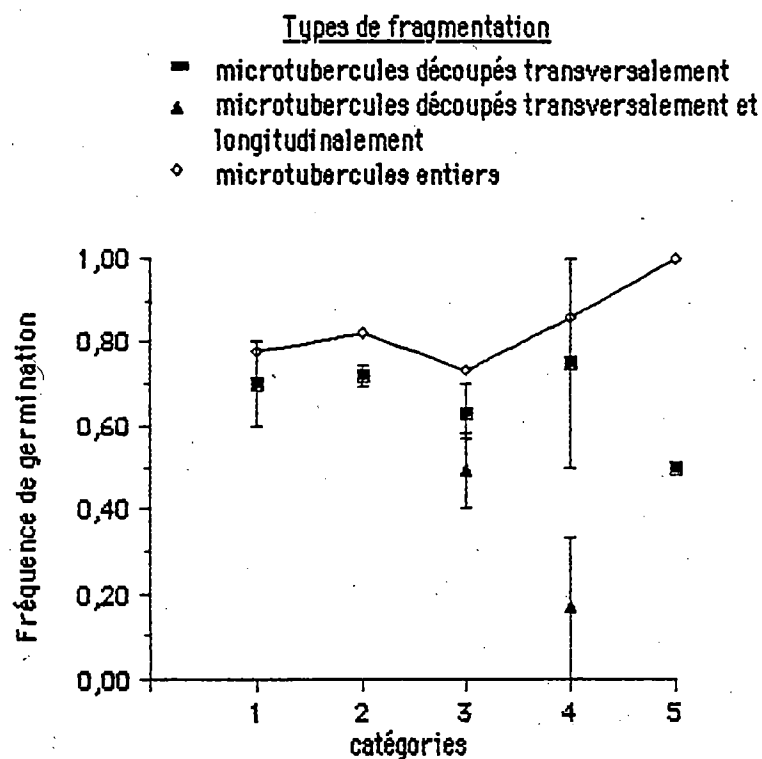


4b



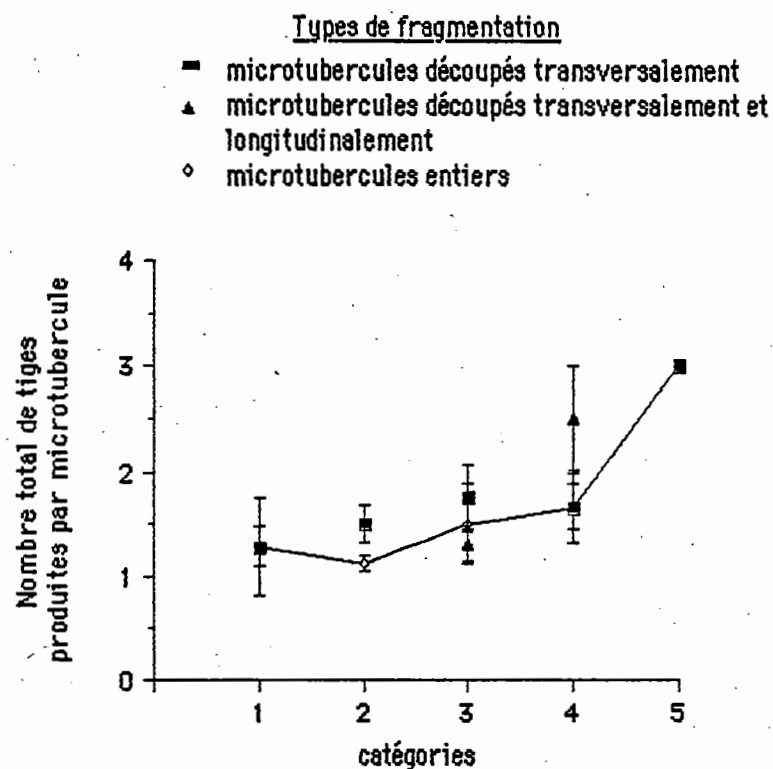
5

Figure 23. Influence de la fragmentation sur la fréquence de germination des microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.



¹ Les catégories représentent, en sens ascendant, des microtubercules de taille croissante. Pour les limites exactes de chacune, voir le tableau IV. Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

Figure 24. Influence de la fragmentation sur le nombre de tiges produites par les microtubercules de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte'.



¹ Les catégories représentent, en sens ascendant, des microtubercules de taille croissante. Pour les limites exactes de chacune, voir le tableau IV. Les barres indiquent l'erreur-type associée à chaque valeur. L'absence de barre représente une erreur-type égale à zéro.

DISCUSSION

1- Evolution des explantats en culture *in vitro*

Lorsque des segments nodaux sont cultivés *in vitro*, les bourgeons axillaires ont le potentiel nécessaire pour produire soit des tiges, soit des microtubercules. L'orientation de l'organogénèse vers l'une ou l'autre de ces structures est déterminée par les hormones contenues dans le milieu de culture (Ammirato, 1976).

La plupart des taxonomistes décrivent l'igname comme une plante possédant trois bourgeons à l'aisselle de chaque feuille (Ayensu, 1972). Cependant Wickham et coll. (1982), au cours d'une étude sur la formation des bulbilles, ont constaté que les jeunes noeuds provenant de plantes cultivées en champs ne portent qu'un seul bourgeon, accompagné toutefois d'un primordium caulinaire. Ce dernier se divise par la suite et donne naissance aux deux autres bourgeons habituellement présents sur les structures nodales matures. Cependant en conditions de stress, il peut poursuivre ses divisions et former un ensemble de bourgeons sériaux. La capacité que possèdent les segments nodaux en culture *in vitro* de produire de multiples tigelles serait liée à un tel phénomène.

Toutefois selon Wickham et coll. (1982), les bulbilles ne proviendraient pas d'une transformation des bourgeons axillaires mais seraient plutôt produites par une zone méristématique sous-jacente à ceux-ci. Cette structure, nommée "Primary nodal complex" (PNC) par Wickham et coll. (1981), pourrait parfois atteindre une taille suffisante pour être visible à l'oeil nu, mais resterait peu développée en présence d'une forte hygrométrie. Ceci expliquerait pourquoi sa présence n'est que rarement notée en culture *in vitro*, l'humidité relative à l'intérieur des contenants étant particulièrement élevée. Cependant, la structure gonflée observée à la base des multiples tigelles qui se forment parfois chez *D. alata* cv. 'Florida' en est probablement dérivée.

Nos observations nous ont permis de constater que la germination des microtubercules se fait de façon très polarisée, les tiges et les racines se formant habituellement dans la région proximale, près du point d'abscission. Une tendance similaire a d'ailleurs été remarquée par Passam et coll. (1982) lors de leurs travaux sur la germination des bulbilles de *D. alata*. Un éclatement du cortex et de l'écorce est parfois visible chez les microtubercules germés *in vitro*. Or les tiges et les racines formées par les bulbilles proviendraient d'une région méristématique située dans le cortex (Wickham et coll., 1981), qui se rompt lors de l'émergence de ces structures. Il est donc possible que les tiges et les racines formés par les microtubercules proviennent aussi d'un tel méristème.

2- Obtention de microtubercules utilisables pour la propagation de l'igname

L'une des applications possibles de la tubérisation *in vitro* est la propagation massale. Au moment de leur récolte, la plupart des microtubercules de *D. abyssinica* et de *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido' portaient déjà des tiges et des racines. Or selon Sengupta et coll. (1984) lorsque de telles structures sont formées chez *D. floribunda*, elles peuvent être plantées directement en terre et acclimatées avec un taux de survie de 100%. Si ces résultats sont applicables aux génotypes étudiés au cours du présent travail, les microtubercules produits pourraient donc être utilisés pour la propagation dès leur récolte. Cependant ceux de très petite taille risquent de ne pas survivre. En effet, Ammirato (1982) observe que les microtubercules de *D. alata* cv. 'Gemelos' et *D. bulbifera* cv. 'Sativa' de taille inférieure à 8 mm et pesant moins de 0,090 g ne réussissent pas à régénérer des plantes lorsqu'ils sont semés directement en terre.

Nos essais ont par la suite montré que même si les tiges formées avant la récolte sont éliminées, les microtubercules possèdent la capacité d'en développer de nouvelles. Toutefois, la germination *de novo* d'un microtubercule paraît être influencée par sa taille. En effet chez *D. abyssinica*, une fréquence de germination optimale est obtenue avec des

microtubercules de taille intermédiaire. Cependant, la diminution observée chez les plus grands microtubercules est peut-être liée à un phénomène de dormance. En effet, il a été remarqué que celle-ci s'établit graduellement pendant la croissance des bulbilles (Hasegawa et Hashimoto, 1973). Si ce phénomène était confirmé, un traitement approprié pourrait éventuellement permettre de lever cette dormance et d'utiliser ces microtubercules pour la propagation.

L'objectif à atteindre pour une propagation massale efficace est donc la production rapide d'un grand nombre de microtubercules de taille suffisante pour germer. Toutefois nos résultats montrent que les conditions de culture où le nombre de microtubercules produits est maximal sont habituellement différentes de celles où leur poids moyen est élevé. En effet, la production d'un nombre important de microtubercules est observé en photopériode de 16 h ou 24 h alors que les microtubercules de poids important sont obtenus en photopériode de 8 h. De même, le nombre de microtubercules produits sur le milieu contenant les sels MS est supérieur à celui obtenu sur le milieu sans NH_4NO_3 mais ceux formés sur ce dernier sont plus gros. Par conséquent, effectuer une culture en deux étapes pour varier les conditions utilisées permettrait peut-être d'optimiser le résultat obtenu.

Plusieurs des noeuds des plantules formées au cours de nos expériences ont tubérisé, permettant ainsi de produire plus d'un microtubercule par explantat mis en culture. Or, certains milieux particulièrement favorables à la tubérisation inhibent complètement la formation de tiges (Ammirato, 1976), diminuant ainsi le nombre de microtubercules pouvant potentiellement être obtenu par explantat.

Enfin, nos observations ont permis de constater que le nombre d'explantats portant des microtubercules ne cesse de croître tout au long de l'expérience, la fréquence de tubérisation étant en général de moins de 50% à la 12^e semaine mais dépassant souvent 80% à la 24^e semaine de culture. Nos résultats montrent donc que, bien que la plupart des chercheurs étudiant la tubérisation aient effectué leurs observations entre

la 6^e et 12^e semaines de culture, l'utilisation d'une durée de culture plus longue permettrait probablement d'augmenter le rendement obtenu.

3- Comparaison de l'influence des paramètres étudiés sur la tubérisation de diverses espèces d'ignames

Alors qu'il existe déjà des protocoles expérimentaux précis pouvant être utilisés pour obtenir la tubérisation *in vitro* de nombreux génotypes de pomme de terre (Estrada et coll., 1986), peu de recherches ont été faites pour déterminer les conditions de culture optimales pour l'igname. Les facteurs exerçant une influence sur ce processus sont nombreux et leur étude en est encore à ses débuts. Un des objectifs du présent travail était d'approfondir notre connaissance de quelques-uns d'entre eux.

3.1- Contenant de culture

Les observations effectuées au cours du présent travail indiquent que le contenant de culture peut exercer parfois une influence réelle sur la tubérisation. Bien que cet effet soit habituellement assez faible, il pourrait devenir significatif chez certaines ignames, comme par exemple chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' où la culture en boîte "Magenta" exerce un effet bénéfique sur le rendement et le poids des microtubercules produits. L'origine de l'influence de ce paramètre reste encore à déterminer mais pourrait dépendre de facteurs comme le volume intérieur du contenant, l'étanchéité du couvercle ou les matériaux composant les parois.

En effet, le volume intérieur du contenant et le degré d'étanchéité de son couvercle affectent la concentration en gaz et en humidité dans celui-ci. Or il est connu que certains gaz, comme par exemple l'éthylène, exercent une influence sur la tubérisation chez la pomme de terre (Melis et Van Staden, 1984). Ils pourraient donc avoir un effet similaire chez l'igname.

L'intensité et la qualité de la lumière sont sans doute modifiées en traversant les parois du contenant. Or ceci pourrait avoir une influence sur la tubérisation. En effet, l'intensité lumineuse à laquelle sont soumises les plantules conservées dans la salle de culture de l'Institut botanique est supérieure à celle régnant dans les incubateurs où sont créés un éclairage constant et une photopériode de 8 h. Or une baisse de rendement et du poids moyen des microtubercules est remarquée chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' lors de cultures en photopériode de 16 h. Il est donc possible que ce phénomène soit relié à cette intensité lumineuse accrue plutôt qu'à la photopériode elle-même.

Actuellement la plupart des cultures *in vitro* sont effectuées en tube. Nos résultats indiquent cependant qu'il pourrait être avantageux de vérifier l'influence de ce contenant sur le rendement obtenu, particulièrement lorsque le poids des microtubercules est un critère important pour l'utilisateur.

3.2- Photopériode

Les observations effectuées chez *D. abyssinica* et chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florido' montrent que même si les microtubercules formés en photopériode de 8 h sont de poids plus élevé que les autres, ce sont les photopériodes de 16 h et 24 h qui permettent la production d'un nombre maximum de microtubercules.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par NG (1988). En effet il a observé que chez *D. rotundata*, le nombre de microtubercules produits aux photopériodes de 12 h, 16 h et 24 h est supérieur à celui noté en photopériode de 8 h. Cependant ce chercheur estime que l'utilisation d'une photopériode de 12 h ou de 16 h devrait être privilégiée puisque les microtubercules formés en éclairage constant sont souvent anormaux, tout comme d'ailleurs ceux produits en photopériode de 8 h.

Or au cours du présent travail, tous les microtubercules produits à de telles photopériodes sont normaux. Toutefois, l'influence exercée par

la présence d'hormones pourrait être à l'origine de cette différence. En effet, Ammirato (1976) constate que les microtubercules obtenus en présence d'une cytokinine (la zéatine) sont anormaux. Or, le milieu utilisé par NG (1988) contient lui aussi une cytokinine (la kinétine) alors que celui employé pour nos expériences ne comporte qu'une auxine (le ANA).

Néanmoins, l'influence de la photopériode pourrait aussi varier selon les espèces. En effet, NG (1988) constate que chez *D. rotundata* la fréquence de tubérisation notée aux photopériodes de 12 h, 16 h et 24 h est supérieure à celle obtenue en photopériode de 8 h. Or chez les trois génotypes utilisés pour le présent travail, la fréquence de tubérisation paraît évoluer de la façon similaire pour toutes les photopériodes étudiées, sauf lorsque ces conditions de culture sont particulièrement défavorables à la survie des explantats.

Une telle variation aurait d'ailleurs aussi été notée à l'intérieur d'une même espèce. En effet, selon Mantel et Hugo (1989) les explantats de *D. bulbifera* soumis à des photopériodes de 12 h et 16 h ne forment pas de microtubercules alors que ceux conservés en photopériodes de 8 h le font. Forsyth et Van Staden (1984) notent quant-à-eux que chez cette espèce la tubérisation est obtenue dès la 4^e semaine en photopériode de 16 h mais qu'elle reste nulle en photopériode de 8 h même après 6 semaines de culture. Toutefois, l'action d'hormones pourrait là aussi être à l'origine de ces divergences. En effet, Mantel et Hugo (1989) emploient un milieu ne contenant pas d'hormone alors que celui de Forsyth et Van Staden (1984) est additionné de kinétine.

3.3- Composition en sels minéraux du milieu nutritif

Les expériences effectuées au cours du présent travail ont permis de constater que chez les deux cultivars de *D. alata*, la culture sur un milieu sans NH_4NO_3 augmente le rendement et le poids moyen des microtubercules. Cet effet est probablement lié à l'absence d'ions ammonium dans ce milieu de culture, bien qu'on ne puisse exclure l'hypothèse qu'il puisse être causé par la diminution globale de la concentration en azote.

En effet, l'absence d'ions ammonium a un effet bénéfique sur la tubérisation *in vitro* chez *D. alata* cv. 'Crop Lisbon' (Mantel et Hugo, 1989) et chez *D. opposita* (Asahira et Nitsch, 1968). De plus chez cette dernière, l'utilisation d'une source d'azote entièrement composée de NO_3 ou présentant un rapport NO_3/NH_4 élevé exerce aussi une influence stimulante (Asahira et Yazawa, 1979). Cependant, il a aussi été remarqué qu'une très forte concentration en azote telle que celle du milieu MS, nuit à la tubérisation (Asahira et Yazawa, 1979 ; Mantel et Hugo, 1989).

Toutefois, l'effet inhibiteur de la composition minérale du milieu MS ne semble pas être généralisable à toutes les espèces d'ignames. En effet selon Mantel et Hugo (1989), la fréquence de tubérisation de *D. bulbifera* sur le milieu MS (avec ou sans ions ammonium) est supérieure à celle obtenue lors de l'utilisation d'un milieu ne contenant que 6% de la concentration en azote, fournie exclusivement sous forme NO_3 .

De même pour les trois génotypes étudiés au cours du présent travail, la fréquence de tubérisation observée sur le milieu MS est similaire à celle obtenue sur les milieux modifiés (MS sans NH_4NO_3 et MS sans KNO_3). De plus, chez *D. abyssinica* la culture sur un milieu sans NH_4NO_3 permet d'obtenir des résultats comparables à ceux du témoin MS et ce, pour les trois autres variables mesurées (rendement, nombre et poids moyen des microtubercules). Cependant, le milieu de culture employé pour nos expériences sur la tubérisation contient une auxine (le ANA) dont l'action est capable de contrer l'effet inhibiteur du milieu MS, comme l'ont démontré Asahira et Yazawa (1979).

Enfin, la culture sur un milieu sans KNO_3 exerce une influence néfaste sur le développement des plantules des trois génotypes étudiés et une forte baisse du rendement est habituellement observée. Ceci est peut-être lié au fait que la concentration en azote y est plus élevée que celle du milieu sans NH_4NO_3 et est fournie dans un rapport NO_3/NH_4 considéré comme inhibiteur par Asahira et Yazawa (1979). Il est cependant possible que cela provienne plutôt de la suppression de la principale source de potassium. En effet, Onwueme (1978) et Degras (1986) affirment que cet

élément est particulièrement important pour le développement et la tubérisation des plantes d'ignames en champ.

4- Hypothèse sur le mode d'action des conditions de culture sur la tubérisation *in vitro*

Le nombre et le poids moyen des microtubercules produits sont souvent affectés de façon opposée par les conditions de culture étudiées. Ils pourraient donc être sous le contrôle de mécanismes différents ou encore, être le résultat d'une compétition pour l'utilisation d'une ou de substances présentes en concentration limitante et dont les déplacements et/ou la synthèse seraient influencés par les conditions de culture. Certains travaux laissent d'ailleurs croire que ces substances pourraient être des hormones, probablement des auxines.

En effet, Asahira et Yazawa (1979) postulent que la source et la concentration en azote influencent la tubérisation en agissant sur le niveau endogène d'auxines. Ils ont d'ailleurs démontré qu'un apport exogène d'ANA permet d'induire la formation de microtubercules chez *D. opposita*, même sur un milieu inhibant normalement ce phénomène. De plus, l'action inductrice de cette hormone ainsi que celle d'une forte concentration en saccharose peuvent être neutralisées par l'ajout d'une anti-auxine telle que l'acide α -(*o*-chlorophénoxy)-isobutyrique (ACPIB) ou l'hydrazide maléique (HM).

Les cytokinines quant-à-elles semblent jouer un rôle plus indirect. En effet, elles ne paraissent stimuler la tubérisation que sur un milieu contenant déjà une auxine (Ammirato, 1976) ou encore, dans des conditions de culture où le niveau endogène d'auxines est présumément accru, comme par exemple en absence d'ions ammonium (Asahira et Nitsch, 1968). La tubérisation pourrait donc être régie par un délicat rapport entre auxines et cytokinines, ces dernières agissant en synergie avec les premières pour en augmenter l'effet inducteur.

Les conditions de culture exerçant une influence similaire sur plusieurs espèces d'ignames, le mécanisme de contrôle de la tubérisation pourrait donc être identique chez toutes. Les différences inter ou intraspécifiques parfois observées seraient alors expliquées par une variation endogène ou exogène de la concentration en hormones.

CONCLUSION

Au cours du présent travail, des microtubercules ont été obtenus chez *D. abyssinica* ainsi que chez *D. alata* cv. 'Brazo fuerte' et 'Florida'. Des essais ont permis de constater qu'ils ont la capacité de germer *in vitro* et de régénérer des plantules normales, confirmant ainsi qu'ils pourront être utilisés pour la micropropagation.

Les expériences effectuées indiquent que, bien que le contenant de culture n'ait habituellement que peu d'effets sur la tubérisation *in vitro*, la photopériode et la composition minérale du milieu nutritif influencent quant-à-elles grandement ce processus. Cependant, les divers paramètres employés pour évaluer la tubérisation (fréquence de tubérisation, rendement, nombre et poids moyen des microtubercules produits) sont affectés de façon différente par les conditions de culture utilisées. L'expérimentateur devra donc choisir les conditions à employer en fonction de l'espèce et de l'utilisation qu'il désire faire des microtubercules produits.

Bien que plusieurs facteurs restent encore à évaluer avant que ce procédé puisse être exploité au maximum, le présent travail fournit des indications utiles pour l'établissement d'un protocole fonctionnel permettant la production de microtubercules *in vitro*. Que ce soit pour faciliter la recherche fondamentale sur l'igname ou pour régler certains problèmes liés à la multiplication et à la distribution des cultivars-élites auprès des améliorateurs et des cultivateurs, la tubérisation *in vitro* ouvre des perspectives intéressantes et les travaux sur le sujet méritent d'être poursuivis. Cette technique pourrait ainsi contribuer au maintien de la culture d'une plante d'excellente valeur nutritive et profondément liée aux traditions de plusieurs populations face à la concurrence sans cesse croissante des cultures d'exportation (café, cacao, hevea...) et de plantes plus facile à cultiver mais de valeur nutritive inférieure comme le manioc (*Manihot utilissima* Pohl.).

REFERENCES

- Ammirato, P.V. 1976. Hormonal control of tuber formation in cultured axillary buds of *Dioscorea bulbifera* and *D. alata* Plant Physiol. 57(suppl): 66.
- Ammirato, P.V. 1982. Growth and morphogenesis in cultures of the monocot yam, *Dioscorea* In: Plant Tissue Culture (Fugiwara, A., ed.) Maruzen, Tokyo. pp. 169-170.
- Ammirato, P.V. 1984. Yams. In: Handbook of Plant Cell Culture, vol. 3, Crop Species. (Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Yamada Y., eds.) MacMillan, New York. pp. 327-354.
- Asahira, T., Nitsch, J.P. 1968. Tubérisation in vitro: *Ullucus tuberosus* et *Dioscorea* Bull. Soc. Bot. Fr. 115: 345-352.
- Asahira, T., Nitsch, J.P. 1969. Effect of polarity and kinetin on the browning reaction of *Dioscorea batatas* and *D. japonica* Planta 84: 292-294.
- Asahira, T., Yazawa, S. 1979. Bulbil formation of *Dioscorea opposita* cultured in vitro. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. 113: 39-51.
- Asokan, M.P., O'Hair, S.K., Litz, R.E. 1983. In vitro plant development from bulbil explants of two *Dioscorea* species. HortScience 18: 702-703.
- Ayensu, E.S. 1972. Anatomy of Monocotyledons. VI. Dioscoreales. Oxford Univ. Press, New York. p. 182.
- Chaturvedi, H.C. 1975. Propagation of *Dioscorea floribunda* from in vitro culture of single-node stem segments. Curr. Sci. 44: 839-841.
- Chaturvedi, H.C., Sharma, A.K., Sharma, M., Prasad, R.N. 1982. Morphogenesis, micropropagation, and germplasm preservation of some economic plants by tissue cultures. In: Plant Tissue Culture (Fugiwara, A., ed.) Maruzen, Tokyo. pp. 687-688.

- Coursey, D.G. 1967. Yams. Longmans, Green and Co., London. p. 230.
- Coursey, D.G. 1976. Yams. *Dioscorea* spp. (*Dioscoreaceae*). In: Evolution of Crop Plants. (Simmonds, N.W., ed.) Longman, London. pp. 70-74.
- Degras, L. 1986. L'igname. G.-P. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T., Paris. p.408
- Estrada, R., Tovar, P., Dodds, J.H. 1986. Induction of in vitro tubers in a broad range of potato genotypes. Plant Cell Tissue Org. Cult. 7: 3-10.
- Forsyth, C., Van Staden, J. 1982. An improved method of in vitro propagation of *Dioscorea bulbifera* Plant Cell Tissue Org. Cult. 1: 275-281.
- Forsyth, C., Van Staden, J. 1984. Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. J. Pl. Physiol. 115: 79-83.
- Hasegawa, K., Hashimoto, T. 1973. Quantitative changes of batatasins and abscisic acid in relation to the development of dormancy in yams bulbils. Plant Cell Physiol. 14: 369-377.
- Heble, M.R., Staba, E.J. 1980. Diosgenin synthesis in shoot cultures of *Dioscorea composita* Planta Med. Supp.: 120-123.
- Lacointe, A., Sinzou, C. 1987. Croissance et développement au champ de l'igname (*Dioscorea alata* L.) à partir de plants produits par la culture in vitro. Agronomie 7(5): 331-338.
- Lakshmi Sita, G., Bammi, R.K., Randhawa, G.S. 1976. Clonal propagation of *Dioscorea floribunda* by tissue culture. J. Hortic. Sci. 51: 551-554.
- Mantell, S.H., Haque, S.Q., Whitehall, A.P. 1978. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by tissue culture. J. Hortic. Sci. 53: 95-98.
- Mantell, S.H., Haque, S.Q., Whitehall, A.P. 1980. Apical meristem tip culture for eradication of flexuous rod viruses in yams (*Dioscorea alata*). Tropical Pest Management 26: 170-179.

- Mantel, S.H., Hugo, S.A. 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. Plant Cell Tissue Org. Cult. 16: 23-37.
- Martin, F.W., Ortiz, S. 1963. Origin and anatomy of tubers of *Dioscorea floribunda* and *D. spiculiflora* Bot. Gaz. 124: 416-421.
- Melis, R.J.M., Van Staden, J. 1984. Tuberization and hormones. Z. Pflanzenphysiol. 113: 271-283.
- Milliken, G.A., Johnson, D.E. 1984. Analysis of messy data. vol.1. Lifetime Learning Publications, Californie. p. 473.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NG, S.Y.C. 1988. In vitro tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). Plant Cell Tissue Org. Cult. 14: 121-128.
- Onwueme, I.C. 1978. Tropical tuber crops. John Wiley and Sons, New York. pp. 1-106.
- Passam, H.C., Wickham, L.D., Wilson, L.A. 1982. Comparative observations on the polarity of sprouting of bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. and *Dioscorea alata* L. Ann. Bot. 49:359-366.
- Purseglove, J.W. 1973. Tropical crops. Monocotyledons. Longmans, Green and Co., London. pp. 97-117.
- Schäfer, W., Görz, A., Kahl, G. 1987. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium* Nature 327: 529-532.
- Scherrer, B. 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin éditeur, Chicoutimi, Canada. p. 850.

- Sengupta, J., Mitra, G.C., Sharma, A.K. 1984. Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda* Plant Cell Tissue Org. Cult. 3: 325-331.
- Singh, J.P. 1978. Effect of nitrogen sources on shoot bud differentiation of *Dioscorea deltoidea* Wall. callus cultures. Biol. Plant. 20: 436-439.
- Sinha, M., Chaturvedi, H.C. 1979. Rapid clonal propagation of *Dioscorea floribunda* by in vitro culture of excised leaves. Curr. Sci. 48: 176-177.
- Uduebo, A.E. 1971. Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Dioscorea bulbifera* Ann. Bot. 35: 159-163.
- Viana, A.M., Mantel, S.H. 1989. Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl. and *D. cayenensis* Lam. Plant Cell Tissue Org. Cult. 16: 113-122.
- Wickham, L.D., Wilson, L.A., Passam, H.C. 1981. Tuber germination and early growth in four edible *Dioscorea* species. Ann. Bot. 47: 87-95.
- Wickham, L.D., Wilson, L.A., Passam, H.C. 1982. The origin, development and germination of bulbils in two *Dioscorea* species. Ann. Bot. 50: 621-627.

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord exprimer ma gratitude au docteur Mario Cappadocia pour m'avoir suggéré ce sujet d'étude. Les commentaires et les encouragements qu'il m'a fournis tout au long de la réalisation de ce projet m'ont beaucoup aidée.

Je voudrais aussi remercier le docteur Hargurdeep Saïni et monsieur Gilles Vincent pour leurs conseils pertinents lors du choix des analyses statistiques, de même que monsieur Denis Lauzer qui a pris les photographies ayant servi à illustrer le présent travail.

Je tiens aussi à mentionner que c'est grâce à une Bourse d'études supérieures que m'a octroyée le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) que j'ai pu me consacrer entièrement à ce projet.

Enfin, le programme de recherche sur l'igname effectué au laboratoire de vitroculture du Dr Cappadocia n'aurait pas pu être mené à bien sans le soutien financier du Centre de recherches pour le développement international (CRDI) et la collaboration du laboratoire de cytogénétique de l'Université d'Abidjan, lequel a gracieusement fourni le matériel végétal ayant servi à initier les cultures *in vitro* d'ignames.